

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



RASTREIO VIROLÓGICO EM ESPÉCIES
SELVAGENS DE ROEDORES
PERTENCENTES À FAUNA PORTUGUESA.

Alexandra Cardoso Ribeiro de Carvalho

Mestrado em Microbiologia Aplicada
2011

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



**RASTREIO VIROLÓGICO EM ESPÉCIES
SELVAGENS DE ROEDORES PERTENCENTES À
FAUNA PORTUGUESA.**

Alexandra Cardoso Ribeiro de Carvalho

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria Filomena Caeiro

Mestrado em Microbiologia Aplicada

2011

Esta dissertação foi redigida de acordo com as regras da antiga ortografia.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
ABSTRACT.....	1
RESUMO.....	2
INTRODUÇÃO.....	3
Infecções Emergentes – Uma Perspectiva Geral.....	3
Zoonoses Virais Emergentes.....	4
A Importância dos Roedores como Reservatórios e Hospedeiros de Zoonoses.....	4
Caracterização das Famílias Virais Estudadas.....	5
<i>Bunyaviridae</i>	5
<i>Arenaviridae</i>	7
<i>Flaviviridae</i>	9
<i>Picornaviridae</i>	10
<i>Herpesviridae</i>	12
Breve Caracterização das Espécies de Roedores Analisadas.....	12
<i>Microtus duodecimcostatus</i>	12
<i>Microtus lusitanicus</i>	13
<i>Apodemus sylvaticus</i>	13
<i>Mus spretus</i>	14
Objectivos.....	14
MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
Equipamento.....	14
Consumíveis.....	15
Reagentes Genéricos.....	15
Amostragem de Roedores.....	16
Extracção de Ácidos Nucleicos.....	16
RNA.....	16
DNA.....	17
RNA e DNA.....	18
Amplificação de Ácidos Nucleicos.....	18
RT-PCR.....	19
PCR.....	20
<i>Nested e Heminested PCR</i>	21
Electroforese em Gel das Amostras Extraídas e dos Produtos Amplificados.....	21
Extracção e Purificação de DNA a partir de Géis de Agarose.....	21
Purificação dos Produtos de Amplificação e Sequenciação.....	22

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
Roedores.....	23
Controlo da Qualidade dos Ácidos Nucleicos presentes nas Amostras.....	23
Rastreio Viroológico.....	28
<i>Bunyaviridae</i>	28
<i>Arenaviridae</i>	28
<i>Flaviviridae</i>	28
<i>Picornaviridae</i>	30
<i>Herpesviridae</i>	31
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
AGRADECIMENTOS.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXOS.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

TABELA 1. <i>Primers</i> utilizados neste estudo.....	19
FIGURA 1. Electroforese de produtos de PCR e de RT-PCR, obtidos com os <i>primers</i> Actin F e Actin R.....	24
FIGURA 2. Electroforese de produtos obtidos com o <i>kit</i> OneStep RT-PCR, usando os <i>primers</i> Actin F e Actin R.....	24
TABELA 2. Resultados obtidos por RT-PCR das amostras dos diferentes órgãos, usando os <i>primers</i> Actin F e Actin R, por roedor.....	27
FIGURA 3. Electroforese de produtos de <i>heminested</i> PCR, obtidos com os <i>primers</i> MAMD, cFD2 e FS 778.....	29
FIGURA 4. Electroforese de produtos de amplificação, obtidos com os <i>primers</i> EMCV F e EMCV R.....	30
FIGURA 5. Electroforese de dois produtos de PCR, provenientes da amplificação com os <i>primers</i> HV e Cons lower de amostras de DNA extraído de fígado com fenol-clorofórmio.....	32
TABELA 3. Resultados obtidos por RT-PCR e PCR para as diversas famílias virais em estudo, por roedor.....	33

ANEXOS

TABELA 1. Dados relativos aos roedores analisados.....	47
TABELA 2. Órgãos em que foram pesquisados os vírus pertencentes às diversas famílias virais em estudo, por roedor.....	48
FIGURA 1. Alinhamento de um segmento genómico viral, obtido através da amplificação com os <i>primers</i> EMCV F e EMCV R de RNA extraído de uma amostra de coração do animal Mi7 (Mi7Picorna), com diversas sequências virais de interesse.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

- AHFV** Vírus da Febre hemorrágica de Alkhurma (*Alkhurma hemorrhagic fever virus*)
- ATCC** *American Type Culture Collection*
- BLAST** *Basic Local Alignment Search Tool*
- bp** Pares de bases (*base pairs*)
- C** Proteína da cápside (*capsid protein*)
- CCR** Região codificante da cápside (*capsid coding region*)
- com. pess.** Comunicação pessoal
- cDNA** Ácido desoxirribonucleico complementar (*complementary deoxyribonucleic acid*)
- DENV** Vírus do Dengue (*dengue virus*)
- DEPC** Dietilpirocarbonato
- DNA** Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- DNase** Desoxirribonuclease (*deoxyribonuclease*)
- dNTP** Desoxirribonucleótido trifostato (*deoxyribonucleotide triphosphate*)
- DOBV** Vírus Dobrava (*Dobrava virus*)
- dsDNA** Ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla (*double strand deoxyribonucleic acid*)
- E** Proteína do invólucro (*envelope protein*)
- EBV** Vírus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus*)
- EDTA** Ácido etilenodiaminotetracético (*ethylenediaminetetraacetic acid*)
- e.g.* *Exempli gratia*
- EMCV/EMC** Vírus da Encefalomiocardite (*Encephalomyocarditis virus*)
- F** *Forward*
- FHSR** Febre hemorrágica com síndrome renal
- GP** Glicoproteína (*glycoprotein*)
- GPC** Precursor da glicoproteína (*glycoprotein precursor*)
- H1N1** Hemaglutinina 1 e Neuraminidase 1
- HCMV** Citomegalovírus humano (*Human cytomegalovirus*)
- Híbrido.** Hibridação
- HIV** Vírus da Imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus*)
- Hsp40** *Heat shock protein 40 kDa*
- HSV-1** Vírus Herpes Simplex tipo 1 (*Herpes Simplex virus type 1*)
- ICTV** Comité Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Virus*)
- i.e.* *Id est*
- IGR** Região intergénica (*intergenic region*)
- IRES** Local interno de ligação aos ribossomas (*internal ribosome entry site*)
- JEV** Vírus da Encefalite japonesa (*Japanese encephalitis virus*)
- KFDV** Vírus da Doença da Floresta de Kyasanur (*Kyasanur Forest disease virus*)

- KSHV** Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (*Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*)
- L** Grande (*large*)
- LCMV/LCM** Vírus da Coriomeningite linfocitária (*Lymphocytic choriomeningitis virus*)
- LIV** Vírus Louping ill (*Louping ill virus*)
- LV** Vírus Ljungan (*Ljungan virus*)
- M** Médio (*medium*)
- M** Proteína membranar (*membrane protein*)
- MCMV** Citomegalovírus murino (*Murine cytomegalovirus*)
- MHV-68** γ -Herpesvírus murino 68 (*Murine γ -herpesvirus-68*)
- MOPS** Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
- mRNA** Ácido ribonucleico mensageiro (*messenger ribonucleic acid*)
- MTHV** Herpesvírus tímico do rato (*Mouse thymic herpesvirus*)
- N** Nucleocápside (*nucleocapsid*)
- NCBI** *National Center for Biotechnology Information*
- NE** Nefropatia epidémica
- NP** Nucleoproteína (*nucleoprotein*)
- NS** Não estrutural (*non-structural*)
- nt** Nucleótidos (*nucleotides*)
- OHFV** Vírus da Febre hemorrágica de Omsk (*Omsk hemorrhagic fever virus*)
- ORF** Fase aberta de leitura (*open reading frame*)
- P.A.** Pró-análise
- PCR** Reacção em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
- Pol.** Polimerase
- Polar.** Polaridade
- POWV** Vírus Powassan (*Powassan virus*)
- PUUV** Vírus Puumala (*Puumala virus*)
- R** *Reverse*
- RCMV** Citomegalovírus de ratazana (*Rat cytomegalovirus*)
- RdRp** Polimerase de ácido ribonucleico dependente de ácido ribonucleico (*ribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase*)
- RNA** Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)
- RNase** Ribonuclease (*ribonuclease*)
- RT-PCR** Reacção em cadeia da polimerase com transcrição reversa (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*)
- S** Pequeno (*small*)
- SAAV** Vírus Saarema (*Saarema virus*)
- SDS** Dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)
- SEOV** Vírus Seoul (*Seoul virus*)
- SIDA** Síndrome da imunodeficiência adquirida
- SCPH** Síndrome cardiopulmonar a hantavírus

SPH Síndrome pulmonar a hantavírus

ssRNA Ácido ribonucleico de cadeia simples (*single strand ribonucleic acid*)

Tam. Tamanho

TBEV Vírus da Encefalite transmitida por carraças (*Tick-borne encephalitis virus*)

Temp. Temperatura

TMEV Vírus da Encefalomielite murina de Theiler (*Theiler's murine encephalomyelitis virus*)

TOPV Vírus Topografov (*Topografov virus*)

Tris Tris(hidroximetil)aminometano

TULV Vírus Tula (*Tula virus*)

UTR Região não traduzida (*untranslated region*)

WMHV Herpesvírus do ratinho-do-campo (*Wood mouse herpesvirus*)

WNV Vírus West Nile (*West Nile virus*)

YFV Vírus da Febre amarela (*Yellow fever virus*)

ABSTRACT

Emergent viral zoonosis are a major concern in this global age, not only as a public health threat, but also because of its implications on livestock production and wildlife conservation. With this in mind, we have conducted a study to survey the presence of viruses belonging to different viral families in several species of wild rodents captured in Central and Southern Portugal, using molecular techniques. We focused not only on well-known zoonotic viruses (*e.g.* genus *Hantavirus*, *Bunyaviridae*; genus *Arenavirus*, *Arenaviridae*; and genus *Flavivirus*, *Flaviviridae*), but also on putative zoonotic agents, such as Encephalomyocarditis virus (EMCV) (*Picornaviridae*), and other previously described muroid viruses that albeit non-zoonotic, can be used as surrogate models of similar human infections (*e.g.* *Herpesviridae*). Our results seem to indicate that the presence of zoonotic viruses, rodent-borne or with rodent reservoirs, is not widespread in Portugal, but we have to bear in mind the small sampling size. In fact, we have only found one true-positive amplification. A *Microtus lusitanicus* vole captured in Portalegre was PCR positive to EMC virus. Due to the 100% similarity between the viral sequence we have found and the one of the EMCV isolate used as a positive control, we will have to discard the possibility of laboratory contamination. As an outcome of this study, we emphasize and strongly encourage a nation-wide survey of rodent-borne viruses (roboviruses), and of other zoonotic viruses with rodent reservoirs.

Keywords: Emergent infections; Viral zoonosis; Roboviruses; Arboviruses; *Bunyaviridae*; *Arenaviridae*; *Flaviviridae*; *Picornaviridae*; *Herpesviridae*; Wild rodents.

RESUMO

As zoonoses virais emergentes são uma das principais preocupações nesta era global, não apenas pelo problema que constituem em termos de saúde pública, mas também pelas suas implicações na indústria pecuária e na conservação da fauna selvagem. Assim sendo, propusemos conduzir um rastreio, com vista a detectar a presença de vírus pertencentes a várias famílias virais em diversas espécies de roedores selvagens capturados no Centro e Sul de Portugal. O nosso estudo incidiu não só sobre alguns vírus zoonóticos bem conhecidos (*e.g.* género *Hantavirus*, *Bunyaviridae*; género *Arenavirus*, *Arenaviridae*; e género *Flavivirus*, *Flaviviridae*), como também sobre potenciais agentes zoonóticos, tais como o vírus da Encefalomiocardite (EMCV) (*Picornaviridae*), bem como outros vírus muróides que, ainda que não sendo zoonóticos, poderão ser usados como modelos de infecções humanas similares (*e.g.* *Herpesviridae*). Os resultados obtidos parecem indicar que a prevalência de zoonoses virais em Portugal, sejam elas transmitidas por roedores ou apenas tendo estes animais como reservatórios silvestres, será baixa. Contudo, há que ter em consideração a pequena dimensão da amostra analisada, que não nos permite ser conclusivos. De facto, apenas um animal – um *Microtus lusitanicus* capturado em Portalegre – apresentou uma reacção de amplificação positiva, aparentando assim estar infectado com o vírus EMC. Dada a correspondência de 100% entre a sequência por nós obtida e uma outra, correspondente ao isolado de referência do EMCV usado como controlo positivo, de futuro teremos que descartar a hipótese de contaminação laboratorial. Como conclusão deste estudo, ressaltamos a necessidade urgente de um plano de rastreio a nível nacional, que vise a identificação e caracterização de robovírus (*rodent-borne viruses*) que circulem em Portugal, bem como de outros vírus zoonóticos que possam ter como reservatórios roedores.

Palavras-chave: Infecções emergentes; Zoonoses virais; Robovírus; Arbovírus; *Bunyaviridae*; *Arenaviridae*; *Flaviviridae*; *Picornaviridae*; *Herpesviridae*; Roedores selvagens.

INTRODUÇÃO

INFECÇÕES EMERGENTES – UMA PERSPECTIVA GERAL

A década de 80 do século XX marcou o regresso das doenças infecciosas a um plano de destaque [1]. Estas constituem a principal causa de mortalidade prematura em crianças e adultos em todo o mundo, sendo que nos países em vias de desenvolvimento a situação é ainda mais grave. Contrariamente àquilo que os notáveis desenvolvimentos no âmbito das ciências médicas poderiam fazer esperar, nos últimos anos tem-se verificado que o papel das doenças infecciosas, tanto na mortalidade como na morbilidade, continua a sobrepor-se a qualquer outro factor. Oito em cada 12 das principais causas de morbilidade devem-se a doenças infecciosas, enquanto que as infecções respiratórias, a malária e a diarreia se contam entre as 10 principais causas de mortalidade [2].

As doenças infecciosas que foram emergindo ao longo da história incluem algumas das pragas mais temidas do passado. Nos dias de hoje, novas infecções continuam a emergir, enquanto que muitas das velhas pragas ainda nos acompanham [3]. Estes são problemas globais, pois tal como foi demonstrado pela recente pandemia de gripe H1N1, caso as circunstâncias sejam favoráveis, uma nova infecção que ocorra em qualquer ponto do mundo, poderá atravessar continentes inteiros no espaço de dias ou semanas.

Poder-se-á definir infecções emergentes como aquelas que sofreram um aumento recente (*i.e.*, nos últimos 20 ou 30 anos) em termos de incidência, impacto, distribuição geográfica ou de hospedeiros (*e.g.* doença de Lyme, tuberculose, vírus West Nile, vírus Nipah); que são causadas por agentes patogénicos que evoluíram (*e.g.* novas estirpes do vírus da gripe, estirpes resistentes de malária) ou que foram descobertos recentemente (*e.g.* vírus Hendra); ou cujo quadro clínico apresenta alterações recentes (*e.g.* síndrome pulmonar a hantavírus) [4; 5]. Mais exemplos de infecções emergentes bem conhecidas incluem o vírus da imunodeficiência humana (HIV)/SIDA, a cólera (variante clássica ou devida a *Vibrio cholerae* O139), a febre do Rift Valley e o síndrome urémico hemolítico causado por certas estirpes de *Escherichia coli* [3].

Berns & Rager e Morse [2; 3] identificaram diversos factores que poderão contribuir para a emergência de doenças infecciosas. São eles, em linhas muito gerais: as alterações ecológicas devidas ao desenvolvimento económico ou da agricultura; o aquecimento global; as alterações demográficas e no comportamento humano; o aumento do comércio e das viagens internacionais; o desenvolvimento tecnológico e industrial; a adaptação e alteração evolutiva dos microorganismos, em particular no que diz respeito ao surgimento e propagação de novas estirpes patogénicas, bem como de resistências a fármacos; e, finalmente, a inadequação dos planos de saúde pública.

ZOONOSES VIRAIS EMERGENTES

De entre todos os agentes patogénicos humanos conhecidos – 1.415, de acordo com o estudo de Taylor *et al.* [6] – estima-se que mais de metade, 61 a 62%, sejam zoonóticos [6 – 10], dos quais 19% são vírus ou priões [6]. Adicionalmente, 73 a 75% das doenças infecciosas emergentes são zoonoses [5; 9; 11], a maioria das quais terão tido como ponto de origem a fauna selvagem, que servirá como principal reservatório para a transmissão de agentes zoonóticos a humanos e animais domésticos, agentes esses que poderão vir a emergir como ameaças à saúde pública [8; 11 – 13].

As zoonoses podem ser definidas como doenças infecciosas transmissíveis entre animais vertebrados e o Homem. Como tal, as zoonoses constituem sistemas com dois ou mais hospedeiros por agente infeccioso, nos quais um dos hospedeiros é o Homem. Assim, as zoonoses são um importante objecto de estudo não só pela sua relevância em termos de saúde humana, como também como modelos para doenças infecciosas multi-hospedeiro em geral. Da mesma forma, também o estudo de infecções não-zoonóticas multi-hospedeiro poderá contribuir para um melhor conhecimento das zoonoses, bem como das origens e evolução das doenças infecciosas humanas em geral [14].

Durante os últimos 20 anos tem-se verificado a emergência ou reemergência de diversas infecções virais. Os hantavírus Sin Nombre e Andes, o coronavírus responsável pelo síndrome respiratório agudo, a gripe aviária, bem como os vírus Nipah e Hendra surgiram em regiões subtropicais ou tropicais. O dengue está a propagar-se a novas áreas e o vírus West Nile já atingiu o Novo Mundo. As infecções causadas por alguns destes vírus apresentam elevadas taxas de mortalidade, podendo assim atrair atenções indesejadas, dado o seu potencial como armas biológicas. Alguns vírus, tais como o vírus da encefalite transmitida por carraças, estão a propagar-se a novas áreas, coadjuvados pelas alterações climáticas e ambientais. A maioria destas infecções virais são zoonoses, sendo, como tal, substancialmente mais difíceis de erradicar do que as infecções virais exclusivamente humanas [15].

Assim, as zoonoses virais emergentes constituem uma importante subdivisão das infecções virais, na medida em que exercem impacto tanto sobre a saúde das populações humanas, como sobre a economia da criação pecuária e indústrias associadas, sendo necessária a comunicação e integração de estratégias de controlo epidemiológico entre os serviços médicos e veterinários. Uma vez que as zoonoses virais emergentes se encontram em franca expansão geográfica, será essencial perceber os factores ecológicos e epidemiológicos que conduziram a essa mesma expansão [16].

A IMPORTÂNCIA DOS ROEDORES COMO RESERVATÓRIOS E HOSPEDEIROS DE ZOONOSES

Desde o início do século XX que a importância prática da compreensão da ecologia de hospedeiros e vectores é reconhecida. O conhecimento dos hábitos reprodutores do mosquito *Aedes aegypti* permitiu o controlo bem sucedido da transmissão do vírus da febre amarela e, em última instância, a finalização do Canal do Panamá em 1914. Entre as várias aplicações de medidas de prevenção de doenças zoonóticas baseadas na ecologia de vectores/reservatórios, podem-se

contar a previsão do risco de contrair a doença de Lyme através da monitorização da produção de bolotas e do seu impacto nas populações de hospedeiros vertebrados de carraças, o controlo das populações de vectores de *Borrelia burgdorferi* e *Yersinia pestis* através da aplicação de acaricidas e insecticidas em roedores e cervídeos, a disseminação de iscos contendo vacinas para o controlo da raiva em raposas, e a utilização de imagens de satélite como forma de prever a actividade da febre do Rift Valley no Leste de África [17].

Os roedores representam actualmente cerca de 42% das espécies conhecidas de mamíferos, o que faz deles a maior ordem dos mamíferos, incluindo 33 famílias, 481 géneros e mais de 2.277 espécies [18]. Tanto os efectivos populacionais (em termos do número de espécies e de indivíduos) como os variadíssimos nichos ecológicos ocupados, fazem dos roedores candidatos ideais a um papel de destaque nos mais diversos ciclos epidemiológicos. A equinococose alveolar, as hantavirose, a leptospirose, bem como certas infecções transmitidas por carraças, são apenas alguns dos exemplos mais comuns na Europa desse mesmo papel [19].

CARACTERIZAÇÃO DAS FAMÍLIAS VIRAIS ESTUDADAS

Bunyaviridae. A família *Bunyaviridae* foi formalmente designada em 1975, contendo actualmente quatro géneros de vírus animais (*Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* e *Hantavirus*) e um género de vírus de plantas (*Tospovirus*), que se replicam no citoplasma celular. A maioria dos vírus pertencentes a esta família são transportados e transmitidos por artrópodes – principalmente mosquitos, carraças, flebotomíneos e tripes [20]. A única excepção são os hantavírus, que são transmitidos através de excreções aerossolizadas de roedores, na sua maioria, e de insectívoros [21]. Os hantavírus em conjunto com os arenavírus, que serão abordados em seguida, constituem o grupo das febres hemorrágicas transmitidas por roedores [17], dando origem ao termo robovírus, do inglês *rodent-borne viruses*, por oposição aos arbovírus (*arthropod-borne viruses*) [22].

O género *Hantavirus*, que inclui cerca de 22 espécies [23], é constituído por vírus de simetria helicoidal, com morfologia pleiomórfica, envolvidos por um invólucro de natureza glicoproteica [24]. Os viriões têm um diâmetro que varia entre 80 e 120 nm, apresentando projecções da glicoproteína de superfície (GP) com 5 a 10 nm, projecções essas que se encontram ancoradas no invólucro bi-lipídico, com uma espessura de 5 a 7 nm [20]. O seu genoma é constituído por três segmentos de RNA circular de cadeia simples e polaridade negativa – ssRNA (–) [15; 24]. O segmento L (grande ou *large*), com 6,4 kb, codifica a RNA polimerase (~ 250 kDa), enquanto que o segmento M (médio ou *medium*), com ~ 3,6 kb, codifica ambas as glicoproteínas Gn (68 – 76 kDa) e Gc (52 – 58 kDa), e o segmento S (pequeno ou *small*), com ~ 1,7 kb, codifica a proteína da nucleocápside N (50 – 54 kDa). Adicionalmente, o segmento S de alguns hantavírus possui uma outra ORF (fase aberta de leitura ou *open reading frame*), denominada Ns, cujo produto ou função são até hoje desconhecidos. Os RNAs mensageiros virais dos bunyavírus não são poliadenilados e encontram-se truncados na extremidade 3', relativamente aos RNAs genómicos. Os mRNAs possuem *caps* metilados nas extremidades 5', bem como 10 – 18 nucleótidos que derivam dos mRNAs celulares do hospedeiro. As extremidades dos três segmentos são conservadas e

complementares entre si, uma característica que tem facilitado a clonagem e descoberta de novos hantavírus [15].

Cada espécie de hantavírus encontra-se primariamente associada a uma única espécie de roedor ou insectívoro, que funciona como hospedeiro e reservatório [25], embora pareçam ter existido algumas trocas de hospedeiro durante as dezenas de milhões de anos de coevolução entre estes vírus e os seus reservatórios animais [15]. Notavelmente, foram já detectados hantavírus em morcegos, gatos-bravos e domésticos, ou mesmo em aves, embora se desconheça se estas espécies animais representam algum risco em termos de infecciosidade [21]. Os roedores associados à transmissão de hantavírus pertencem a duas subfamílias da família *Muridae*: *Murinae* (Velho Mundo) e *Sigmodontinae* (Novo Mundo); e a uma outra subfamília da família *Cricetidae*: *Arvicolinae* (Velho Mundo) [22; 26]. Através da análise filogenética de sequências nucleotídicas, verificou-se que os hantavírus se agrupam em três clades distintos, de acordo com a subfamília do roedor a que se encontram associados [27].

Tal como sucede com muitas outras zoonoses, os hantavírus produzem uma infecção geralmente assintomática e persistente no roedor hospedeiro, que não diminui a longevidade nem o potencial reprodutor do animal [23; 25; 28]. Ainda que a infecção não seja deletéria na maioria dos casos, foram detectadas alterações histopatológicas em alguns roedores [28]. Essa infecção resulta numa curta fase de virémia, que inclui a disseminação do vírus para os pulmões, glândulas salivares e rins [25]. As partículas virais são excretadas na urina, saliva e fezes do animal durante períodos prolongados – provavelmente, durante toda a vida – não obstante a presença de anticorpos neutralizantes [25; 28]. A infecção enzoótica será mantida através de transmissão por via horizontal (*e.g.* exposição a materiais contaminados com secreções infectadas, hábitos de *grooming* e mordeduras decorrentes de lutas intraespecíficas), enquanto que a transmissão vertical será negligenciável ou mesmo inexistente [25; 29]. Como já foi referido, os hantavírus são transmitidos à espécie humana principalmente através de aerossóis de urina, fezes ou saliva contaminada de roedores, embora também possam ser transmitidos através de alimentos ou mãos contaminadas com estas excreções. Adicionalmente, poderão ocorrer casos de infecção humana devido a mordeduras ou arranhões de roedores. A transmissão directa entre seres humanos, embora possível (*e.g.* vírus Andes na Argentina e no Chile), ainda não se encontra totalmente esclarecida [21; 26].

Os hantavírus são os agentes causadores de febres hemorrágicas com síndrome renal (FHSR) na Eurásia [15] e do síndrome pulmonar a hantavírus (SPH) nas Américas – embora alguns investigadores tenham começado recentemente a empregar o termo síndrome cardiopulmonar a hantavírus (SCPH) [30] – sendo exemplos por excelência de agentes infecciosos emergentes e reemergentes. Apenas alguns hantavírus causam infecções sintomáticas em humanos. Na Europa foram identificados três principais hantavírus patogénicos: o vírus Puumala (PUUV), transmitido por roedores da espécie *Myodes glareolus*, que causa uma patologia relativamente ligeira, denominada nefropatia epidémica (NE); o vírus Dobrava (DOBV), associado à espécie *Apodemus flavicollis*, que causa uma forma grave de FHSR; bem como o vírus Saaremaa (SAAV), genética e antigenicamente próximo do DOBV, que é transmitido por *Apodemus agrarius* e causa uma

patologia ligeira, semelhante à NE. Há também relatos da presença do vírus Seoul (SEOV) transmitido por ratazanas (*Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*), que causa FHSR de gravidade intermédia. Adicionalmente, as espécies de ratos-cegos *Microtus arvalis* e *Microtus rossiaemeridionalis* são reservatórios do vírus Tula (TULV), que causa infecções humanas aparentemente assintomáticas. O vírus Topografov (TOPV), isolado a partir de lemingues-siberianos (*Lemmus sibiricus*), não foi detectado nos lemingues do Norte da Europa (*Lemmus lemmus*) [15].

As infecções por hantavírus são relativamente comuns na Europa [27]. O PUUV é comum no Norte da Europa, na Rússia europeia e em certas zonas da Europa Central [15], tendo já sido detectado na Alemanha [31], Áustria [32], Bélgica [33], Dinamarca [34], Eslováquia [35], Eslovénia [36], Finlândia [37], França [38], Noruega [39], Polónia [40] e Suécia [41]. O DOBV pode ser encontrado nos Balcãs [15] e Europa Central, tendo já sido detectado na Alemanha [42], Eslováquia [35], Eslovénia [43], Estónia [44], Grécia [45], Hungria [46], Itália [47], Polónia [40], República Checa [48] e Rússia [49]. O SAAV foi detectado na Europa Central e de Leste (e.g. Alemanha, Dinamarca, Eslováquia, Eslovénia, Estónia, Hungria e Rússia [50]), embora a sua epidemiologia não se encontre bem definida [15]. O TULV foi identificado na Alemanha [51], Áustria [32], Cazaquistão [52], Eslováquia [53], Eslovénia [54], França [55], Países Baixos [56], República Checa [57], Rússia [58] e Sérvia/Jugoslávia [59]. Excluindo as infecções laboratoriais, o SEOV foi detectado apenas na França [15].

Cerca de 150.000 a 200.000 casos de FHSR envolvendo hospitalização são reportados anualmente em todo o mundo, mais de metade dos quais ocorre na China, seguindo-se a Rússia, Coreia, Japão, Finlândia, Suécia, Bulgária, Grécia, Hungria, França, e os países balcânicos que constituíam o território da antiga Jugoslávia [29]. A infecção por hantavírus causadores de FHSR apresenta um período de incubação de 2 – 4 semanas, após o que se segue um quadro clínico caracterizado por cinco fases que se sobrepõem, mas que podem não ser evidentes: febre, hipotensão, oligúria, diurese e convalescença. As taxas de mortalidade variam entre 0,1 – 0,4% para a NE causada pelo PUUV, e 7 – 12% para a FHSR causada pelo DOBV [27].

No Norte da Europa, a FHSR e os roedores a que se encontra associada exibem picos em ciclos regulares de 3 – 4 anos, enquanto que na Europa Central a incidência desta infecção segue as flutuações na disponibilidade de sementes de faia e de carvalho, que servem de alimento a esses roedores. Assim, a FHSR na Europa Central apresenta um pico durante o Verão, enquanto que no Norte da Europa a maioria dos casos ocorrem no final do Outono e início do Inverno (Novembro – Janeiro) [15]. A infecção é mais comum em homens do que em mulheres, e numa faixa etária entre os 20 – 40 anos, apesar de as crianças também poderem ser infectadas [21].

Arenaviridae. A família *Arenaviridae* é constituída por um único género – *Arenavirus* – que, de acordo com o último relatório do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), inclui 22 espécies virais. Contudo, em anos recentes foram descritas cerca de nove potenciais novas espécies, que ainda não foram incluídas na lista do ICTV [60]. Os arenavírus têm partículas virais esféricas ou pleiomórficas, com um diâmetro médio de 120 nm (varia entre 50 – 300 nm), um

invólucro lipídico com projecções glicoproteicas, e que se replicam no citoplasma da célula hospedeira. Os viriões englobam, habitualmente, durante a maturação, alguns ribossomas celulares, adquirindo granulações com a aparência de pequenos grãos de areia, visíveis em microscopia electrónica. Daí a designação de *arena* que, em latim, significa areia [15; 61; 62].

O genoma dos arenavírus é constituído por dois segmentos de RNA de cadeia simples e polaridade negativa – ssRNA (–). Ambos os segmentos L (~ 7,3 kb) e S (~ 3,5 kb) usam uma estratégia de expressão *ambisense*, por forma a codificar duas ORFs não sobrepostas de polaridade contrária, separadas por uma região intergénica não codificante (IGR), que poderá apresentar uma estrutura estável em *hairpin*. O segmento L codifica a RNA polimerase viral RNA-dependente RdRp (ou polimerase L) (~ 200 kDa) e uma pequena proteína da matriz que captura o zinco (proteína Z) (~ 11 kDa), enquanto que o segmento S codifica o precursor da glicoproteína viral GPC (~ 75 kDa) – que é clivado para originar as proteínas do invólucro G1 e G2 – e a nucleoproteína NP (~ 63 kDa). As sequências terminais não traduzidas 5' e 3' de cada um dos segmentos genómicos possuem uma complementaridade reversa muito conservada, que abrange 19 nucleótidos em cada extremidade, 17 dos quais são idênticos [60; 62].

A maioria dos arenavírus são transmitidos por roedores, exceptuando o vírus Tacaribe, que foi isolado apenas em morcegos frugívoros. Os arenavírus causam infecções crónicas, geralmente assintomáticas, nos roedores hospedeiros, com produção contínua de partículas virais infecciosas, partículas essas que estão presentes no sangue, sendo também excretadas nos fluidos corporais (saliva, urina e sémen) [15; 63]. A transmissão aos seres humanos ocorre através do contacto com animais infectados, ou através da inalação das suas secreções ou excreções [60]. O surgimento e incidência das infecções por arenavírus encontra-se associado à distribuição das espécies de roedores que lhes servem de reservatório, bem como à dinâmica populacional destes animais [15]. Tal como sucede com os hantavírus, cada espécie de arenavírus encontra-se geralmente associada a uma única espécie de roedor pertencente à família *Muridae* [22]. De acordo com as suas propriedades antigénicas, distribuição geográfica e local de isolamento, os arenavírus subdividem-se em dois grupos, ambos monofiléticos: o serocomplexo do Velho Mundo (ou Lassa-Coriomeningite linfocitária (LCM)), constituído por uma única linhagem, e o serocomplexo do Novo Mundo (ou Tacaribe), constituído por quatro linhagens (clades A, B, C e A/Rec). Cada um destes grupos encontra-se associado a roedores pertencentes à subfamília *Murinae* (Velho Mundo), ou às subfamílias *Sigmodontinae* e *Neotominae* (Novo Mundo) [60; 64; 65]. Diversos estudos sugerem a ocorrência de coevolução entre os arenavírus e os seus reservatórios naturais [63; 64].

Dado o potencial para a transmissão directa de arenavírus entre humanos, bem como a elevada probabilidade das formas aerossolizadas destes vírus serem altamente infecciosas, diversos membros de ambos os serocomplexos foram incluídos na Categoria A de agentes biológicos que representem uma ameaça considerável em termos de biosegurança, o que significa que a sua propagação é permitida apenas em laboratórios de Nível 4 (P4) [15; 66]. Estes arenavírus altamente patogénicos incluem os vírus Junin, Machupo, Guanarito, Sabia (América do Sul, Novo Mundo) e Lassa (África, Velho Mundo). Todos causam febres hemorrágicas potencialmente fatais

em humanos, sendo considerados potenciais agentes de bioterrorismo. Na Europa, as infecções por estes vírus ocorrem muito esporadicamente, e apenas como casos importados [15].

O único arenavírus endémico conhecido no continente europeu é o vírus da Coriomeningite linfocitária (LCMV) – o vírus-protótipo da família, que foi isolado pela primeira vez em 1933 [60] – que se demonstrou circular em populações de *Mus musculus*, estando também associado a epidemias derivadas de hamsters de estimação. Há relativamente pouca informação quanto à actual distribuição do LCMV na Europa, mas existem evidências que o vírus também se encontra associado a outras espécies de roedores [47; 67 – 69]. Na espécie humana, a maioria das infecções por LCMV são assintomáticas ou assemelham-se a um síndrome gripal. Em alguns casos poderá ocorrer meningite asséptica ou meningoencefalomielite. O LCMV também poderá causar infecções congénitas, que conduzem a hidrocefalia, microcefalia, coriorretinite e atraso mental ou psicomotor [15]. As infecções por LCMV raramente são fatais, embora informações recentes sugiram que se tratem de um importante factor de mortalidade tanto em transplantados, como em doentes imunocompetentes [60].

Flaviviridae. A família *Flaviviridae* é constituída por três géneros virais (*Hepacivirus*, *Flavivirus* e *Pestivirus*) e por uma espécie sem género atribuído (vírus da hepatite G) [70]. O género *Flavivirus* contém mais de 70 espécies virais responsáveis por infecções graves em humanos e animais, a maioria das quais tem vectores artrópodes (arbovírus), sendo transmitidas aos hospedeiros vertebrados por mosquitos ou carraças [71]. Diversos membros deste género, tais como o vírus do Dengue (DENV), o vírus da Febre amarela (YFV), o vírus West Nile (WNV), o vírus da Encefalite japonesa (JEV) e o vírus da Encefalite transmitida por carraças (TBEV), são altamente patogénicos para a espécie humana, constituindo um dos principais problemas internacionais em termos de saúde pública [72].

Os viriões dos flavivírus são pequenas partículas esféricas, com um invólucro lipídico, um diâmetro de 40 – 60 nm e replicação citoplasmática. O genoma destes vírus é constituído por um único segmento de RNA linear de cadeia simples e polaridade positiva – ssRNA (+) – com cerca de 11 kb de comprimento, contendo um *cap* na extremidade 5' (importante para a estabilidade e tradução do mRNA) e sem cauda poliadenilada. A única ORF codifica três proteínas estruturais: a proteína da cápside C (13 kDa), a proteína membrana M (8,5 kDa) – originada pela clivagem do precursor prM – e a proteína do invólucro E (51 – 59 kDa); bem como sete proteínas não estruturais: NS1 (glicoproteína), NS2A, NS2B (componente da protease), NS3 (actividade da protease, helicase e NTPase), NS4A, NS4B e NS5 (polimerase RNA-dependente). As extremidades 5' e 3' do genoma são regiões não codificantes. O RNA genómico viral é, por si só, infeccioso, tendo a capacidade de produzir progenia viral se introduzido em células susceptíveis [15; 73].

O flavivírus mais importante na Europa é o TBEV, que é endémico em muitos países europeus, bem como na Rússia, no Norte da China e do Japão, afectando anualmente milhares de pessoas [15]. O TBEV, em conjunto com outros vírus genética e antigenicamente próximos, pertence ao grupo dos flavivírus de mamíferos transmitidos por carraças, que também inclui o vírus da Febre hemorrágica de Omsk (OHFV), o vírus da Doença da Floresta de Kyasanur (KFDV),

o vírus da Febre hemorrágica de Alkhurma (AHFV), o vírus Louping ill (LIV), o vírus Powassan (POWV), entre outros. Este grupo de vírus é também conhecido como o serocomplexo TBEV. O TBEV, o LIV e o POWV causam encefalites em humanos e animais, enquanto que o OHFV, KFDV e AHFV causam febres hemorrágicas [73]. Taxonomicamente, o TBEV é classificado como uma espécie com três subtipos: o subtipo Europeu (engloba praticamente todos os isolados conhecidos na Europa), o subtipo Siberiano (prevalente nos Urais, Sibéria e Leste da Rússia) e o subtipo do Extremo Oriente (prevalente no Leste da Rússia, China e Japão). O primeiro subtipo é geralmente transmitido por carraças da espécie *Ixodes ricinus*, enquanto que os restantes dois se encontram associados a *Ixodes persulcatus* [15; 74]. A distribuição do TBEV encontra-se correlacionada com a distribuição dos seus vectores [15]. Nas carraças, o vírus propaga-se por transmissão transovárica, transtadial, sexual, virémica e não-virémica. Durante a refeição de sangue no animal hospedeiro, o vírus pode ser transmitido em ambas as direcções [75], *i.e.*, a carraça pode não só transmitir o TBEV ao hospedeiro vertebrado, como também o pode transmitir a outras carraças não infectadas por via da coalimentação, mesmo que o hospedeiro não apresente virémia detectável. A maioria das infecções humanas ocorrem igualmente durante a refeição de sangue [73].

Ao contrário do que sucede com diversos flavivírus transmitidos por mosquitos, o ciclo de transmissão deste e doutros flavivírus transmitidos por carraças não é suportado pela espécie humana [76]. Assim, o TBEV é mantido em circulação através de ciclos envolvendo ixodídeos e mamíferos selvagens, roedores em particular. O roedor hospedeiro permite não só a manutenção do vírus durante longos períodos de tempo através de uma infecção persistente, como também o amplifica; para além de funcionar como reservatório na natureza [73]. Um estudo recente indica inclusivamente que poderá ocorrer transmissão vertical do TBEV nos roedores [75].

O TBEV é um vírus neurotrópico. As infecções causadas pelas estirpes do subtipo Europeu são, tipicamente, bifásicas: após um período de incubação de 7 – 14 dias (com extremos de 4 – 28 dias) segue-se uma primeira fase (virémica) – que pode ser assintomática ou apresentar-se como um síndrome gripal indistinto – à qual frequentemente se sucede um intervalo sem sintomatologia de cerca de 1 semana. A segunda fase ocorre em 20 – 30% dos doentes infectados, e é caracterizada por quatro manifestações clínicas de gravidade diversa (meningite, meningoencefalite, meningoencefalomielite ou meningoradiculoneurite), bem como pelo surgimento de anticorpos específicos no soro e no líquido. A taxa de mortalidade varia entre 0,5 – 2%, podendo aumentar com a idade do doente [15; 74].

O LIV é um outro flavivírus existente na Europa que poderá ter um ciclo de transmissão associado a roedores [15]. Apesar de afectar principalmente ovelhas, foram reportados casos de infecção por este vírus em funcionários de laboratório, agricultores, funcionários de matadouros, talhantes e num cirurgião veterinário. A apresentação clínica da infecção causada pelo LIV é idêntica àquela causada pelo TBEV [76].

Picornaviridae. A família Picornaviridae é constituída por um numeroso conjunto de pequenos vírus ubiquitários, que circulam na Natureza, quer entre as comunidades humanas, quer entre os animais. Desta família fazem parte cerca de 230 espécies ou serótipos virais, repartidas por

nove géneros [77]. Os picornavírus possuem pequenas partículas virais (20 – 30 nm) sem invólucro, com uma cápside icosaédrica, replicação citoplasmática e um genoma de RNA de cadeia simples e polaridade positiva – ssRNA (+) – com cerca de 7,5 a 8,2 kb de comprimento [77 – 79]. O genoma da maioria dos picornavírus contém uma única ORF, que codifica as quatro proteínas estruturais que constituem a região codificante da cápside (CCR), bem como oito proteínas não estruturais. A região codificante é flanqueada por duas regiões não traduzidas (UTR) nas extremidades 5' e 3'. A UTR 5' (0,6 – 1,3 kb) contém sinais reguladores da replicação e tradução; na metade 3' da UTR 5' encontra-se um local interno de ligação aos ribossomas (IRES), fundamental para a iniciação *cap*-independente da tradução. A UTR 3' termina numa cauda poliadenilada heterogénea, que está envolvida no processo de ligação da RdRp, cujo gene se localiza a montante da UTR 3' [79; 80]. Tal como sucede com os flavivírus, o ácido nucleico dos picornavírus serve de mRNA e é, ele próprio, infeccioso, sendo capaz de iniciar o ciclo de replicação viral [77].

O vírus da Encefalomiocardite (EMCV) é um picornavírus pertencente ao género *Cardiovirus*, que apresenta uma distribuição mundial [81]. Os pequenos roedores, e as ratazanas em particular, são geralmente considerados reservatórios naturais e veículos de transmissão do EMCV, nos quais o vírus normalmente persiste assintomaticamente, podendo também causar lesões cardíacas, pancreáticas, testiculares e a nível do sistema nervoso central [81 – 83]. A transmissão do vírus, quer entre roedores conspecíficos, quer entre roedores e animais de outras espécies, acontece por via fecal-oral [83], embora pouco se saiba acerca dos mecanismos de transmissão deste vírus [84]. Apesar de ser considerado um vírus dos roedores, o EMCV infecta naturalmente um vasto leque de outros vertebrados – tratando-se, como tal, de um potencial agente zoonótico – de entre os quais os suínos são considerados a espécie doméstica mais susceptível [80]. Adicionalmente, o EMCV foi também isolado em diversas espécies de roedores, elefantes, guaxinins, marsupiais, galiformes e suídeos selvagens, primatas (chimpanzés, babuínos, macacos, lémures e saguis) [82; 83; 85], encontrando-se, na maioria dos casos, associado a miocardites fatais [86]. Na espécie humana, os poucos casos documentados de infecção pelo EMCV encontram-se associados a febre, rigidez do pescoço, letargia, delírio, dores de cabeça e vómitos [83]. Contudo, uma vez que esta infecção é tão pouco frequente em humanos, é difícil estabelecer uma correlação positiva com o EMCV [84]. Ainda assim, o interesse por este vírus tem aumentado, dada a possibilidade de transmissão através do xenotransplante de órgãos de suínos infectados [85].

O vírus da Encefalomielite murina de Theiler (TMEV) é um cardiovírus que causa infecções entéricas assintomáticas em ratinhos e, com menor frequência, paralisia. Um estudo de 2001 indica que os ratinhos da espécie *Mus musculus* serão o seu reservatório natural. Tal como sucede com o EMCV, o TMEV é transmitido por via fecal-oral, mas ao contrário daquele primeiro, o TMEV apresenta um leque de hospedeiros muito restrito, tendo até hoje sido apenas isolado a partir dos já referidos ratinhos e de ratos de laboratório [87].

O vírus Ljungan (LV) é um picornavírus do género *Parechovirus*, descoberto recentemente em ratos-cegos da espécie *Myodes glareolus*, capturados na Suécia, que causa diabetes e miocardite nos roedores, e que se pensa também poder estar associado a miocardites em humanos [88]. De

facto, diversos estudos não só na Suécia [89], como também nos Estados Unidos, indicam que o LV será um provável patógeno zoonótico [90].

Herpesviridae. A família *Herpesviridae* é constituída por vírus de grandes dimensões, com um genoma de DNA de cadeia dupla – dsDNA – encontrando-se incluída na ordem *Herpesvirales*. O virião apresenta uma morfologia característica, com uma cápside icosaédrica com cerca de 115 – 130 nm, envolvida por um invólucro bilipídico, que é separado da cápside por uma matriz proteica denominada tegumento, e que confere à partícula um diâmetro total de, aproximadamente, 200 nm [91 – 93]. O genoma dos herpesvírus é dos maiores que se conhecem em vírus de mamíferos, podendo apresentar até 200 potenciais ORFs [94]. Para além do Homem, os herpesvírus infectam também um grande número de espécies animais. Aqueles que infectam répteis, aves e mamíferos foram agrupados nas subfamílias *Alphaherpesvirinae* (α -herpesvirinae), *Betaherpesvirinae* (β -herpesvirinae) e *Gammapherpesvirinae* (γ -herpesvirinae) [92].

Os herpesvírus são vírus citolíticos que, após uma primoinfecção, permanecem no organismo do hospedeiro sob forma latente [95]. Os herpesvírus de roedores, de ratinhos e ratazanas em particular, são usados como modelos de infecções por herpesvírus humanos análogos, sendo um ferramenta valiosa no estudo de vários aspectos da interacção vírus-hospedeiro. Os herpesvírus humanos geralmente não se replicam nos animais de laboratório, e, se o fazem, geralmente não provocam sintomas que reflectam aqueles observados em humanos.

O γ -Herpesvírus murino 68 (MHV-68) (γ -herpesvirinae, género *Rhadinovirus*), que já foi isolado em *Myodes glareolus*, *Apodemus flavicollis* e *Apodemus sylvaticus*, mimetiza outros γ -herpesvírus humanos, como o Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV) e o vírus de Epstein-Barr (EBV), embora a sua patologia nem sempre replique na totalidade a dos vírus humanos [96]. O Citomegalovírus murino (MCMV) e o Citomegalovírus de ratazana (RCMV) (β -herpesvirinae, género *Muromegalovirus*), isolados, respectivamente, em *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*, são usados para estudar a patogénese do Citomegalovírus humano (HCMV) [97]. Outros exemplos de herpesvírus de roedores incluem o Herpesvírus tímico do rato (MTHV) e o Herpesvírus do ratinho-do-campo (WMHV), qualquer um deles sem subfamília ou género atribuído [98].

Os herpesvírus coevoluíram em conjunto com os seus hospedeiros, embora estejam descritos casos de transferência de linhagens virais entre hospedeiros evolutivamente distantes. No seu todo, os dados filogenéticos disponíveis indicam um número muito reduzido de espécies-hospedeiro e uma elevada especificidade dos herpesvírus. Ainda assim, estes dados também revelam um potencial residual para atravessar a barreira específica e infectar novos hospedeiros, o que levanta diversas questões quanto ao potencial zoonótico destes vírus [99].

BREVE CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES DE ROEDORES ANALISADAS

Microtus duodecimcostatus. O rato-cego-mediterrânico é um animal de pequenas dimensões (comprimento total: 127,5 mm; peso: 28 g), com o corpo cilíndrico, cabeça arredondada

e pouco distinta do tronco, orelhas e olhos pequenos e pouco visíveis, cauda curta, dorso castanho-amarelado e ventre cinzento-claro. Em Portugal, é comum no Centro e Sul do território continental, ocorrendo em densidades elevadas nas áreas agricultadas, pomares, hortas e campos de arroz, onde pode ser considerado praga, também podendo estar presente em sobreirais, pinhais e olivais, principalmente se existe densa cobertura de gramíneas. Tem uma dieta essencialmente herbívora, consumindo raízes, rizomas, tubérculos e frutos. A sua reprodução pode ser contínua ao longo do ano, com picos na Primavera e no Outono; em média, cada fêmea origina anualmente 5 – 6 ninhadas, de 2 – 5 crias, com um período de gestação de cerca de 3 semanas. Habita túneis subterrâneos construídos, com o auxílio dos dentes incisivos e das patas posteriores, até cerca de 50 cm sob o solo, onde localiza o ninho e desempenha a maioria das funções vitais. Apresenta uma actividade circadiana trifásica, caracterizada por picos que se sucedem aproximadamente de 4 em 4 horas; ao longo do ano observam-se dois períodos de actividade máxima, na Primavera e no Outono, possivelmente relacionados com o ciclo reprodutor. A duração de vida na Natureza é de 15 – 18 meses, embora em cativeiro possa viver cerca de 30 meses [100].

***Microtus lusitanicus*.** O rato-cego é um animal de pequenas dimensões (comprimento total: 115 mm; peso: 18 g), semelhante ao rato-cego-mediterrânico. Apresenta o dorso quase sépia, ventre acinzentado e cauda bicolor. Em Portugal, é comum no Norte e Centro do território continental, sendo muito abundante em pomares e hortas, onde pode ser considerado praga, mas também pode ocorrer em áreas de vegetação herbácea, como prados e lameiros. A dieta e a reprodução são idênticas às de *M. duodecimcostatus*, embora esta última não apresente picos sazonais. Também constrói túneis subterrâneos, a uma profundidade que varia entre 10 – 30 cm. Apresenta uma actividade diurna repartida por três períodos: de manhã, ao início da tarde e ao anoitecer, sendo provável que este ritmo de actividade se prologue durante a noite. A longevidade na Natureza é de cerca de 18 meses [100].

***Apodemus sylvaticus*.** O ratinho-do-campo (comprimento total: 185 mm; peso: 22 g) apresenta o corpo alongado com a cabeça bem separada do tronco, focinho pontiagudo, cauda longa, dorso castanho-amarelado, mais escuro na parte média, e ventre esbranquiçado, evidenciando-se uma mancha amarela no peito. Em Portugal, é conhecido em todo o território continental, podendo ser localmente bastante abundante, ocorrendo caracteristicamente em bosques, áreas florestais e áreas agrícolas, desde o nível do mar até elevadas altitudes, podendo viver em associação com o Homem. A sua dieta é muito variada, incluindo grãos e sementes, plantas verdes, frutos silvestres, insectos e outros invertebrados. A sua reprodução é quase contínua ao longo do ano com dois períodos bem marcados: Fevereiro – Julho e Setembro – Novembro; a gestação dura cerca de 26 dias e cada fêmea pode produzir várias ninhadas por ano, de 4 – 6 crias. Também cava túneis subterrâneos a profundidades até cerca de 18 cm, onde usualmente constrói os ninhos. Tem uma actividade quase exclusivamente nocturna, sendo os machos mais activos que as fêmeas; não hiberna mas pode ser encontrado em torpor quando as temperaturas são baixas. A longevidade na Natureza não deve ultrapassar os 18 meses [100].

Mus spretus. O ratinho-ruivo é um animal de pequenas dimensões (comprimento total: 155 mm; peso: 14 g), com o corpo alongado, orelhas e olhos desenvolvidos, focinho pontiagudo, cauda longa, dorso acastanhado (eventualmente acinzentado ou avermelhado), ventre esbranquiçado ou ligeiramente amarelado e cauda bicolor. Em Portugal, é localmente muito abundante em todo o território continental, evidenciando preferência por biótopos secos; ocorre em áreas cultivadas, jardins, vinhas, pinhais e campos de gramíneas; em geral, não entra nas habitações humanas. Tem uma dieta predominantemente herbívora, consumindo sementes, folhas, caules e frutos. A actividade reprodutora parece ser máxima durante a Primavera e o Verão, e mínima durante o Inverno; o número de crias por ninhada é, em média, de 5. A sua actividade é essencialmente nocturna, com picos aos amanhecer e ao anoitecer. Na natureza, raramente este animal sobrevive a dois Invernos [100].

OBJECTIVOS

Com este estudo pretende-se: 1) em primeira instância, efectuar um rastreio da presença de diversos vírus, zoonóticos e não só, em várias espécies selvagens de roedores pertencentes à fauna portuguesa; 2) otimizar metodologias moleculares de detecção virológica em roedores, com vista à sua aplicação a um plano de rastreio em larga escala; 3) identificar os potenciais agentes virais detectados através da análise de sequências nucleotídicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

EQUIPAMENTO

Conjunto de micropipetas P10, P100 e P1000 (Boeco)

Conjunto de micropipetas Nichipet 5000 DG P20, P200 e P1000, dedicadas a RNA (Nichiryo)

Conjunto de micropipetas CoolPet-V P10, P200 e P1000, dedicadas a PCR (Orange Scientific)

Micropipeta PIPETMAN Classic P20, dedicada a PCR (Gilson)

Microcentrífuga Spectrafuge 16M (Labnet)

Microcentrífuga Biofuge 13 (Heraeus Sepatech)

Centrífuga refrigerada Sigma 2k15 (B. Braun)

Centrífuga de vácuo SpeedVac DNA 110 (Savant)

Agitador de vórtex Vibrofix VF1 Electronic (Junke & Kunkel Ika-Werk)

Termoagitador orbital Novotron (Infors HT)

Bloco seco AccuBlock Digital Dry Bath (Labnet)
 Espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific)
 Congelador -80 °C (Snijders Scientific)
 Congelador -20 °C (Jocel)
 Frigorífico 4 °C (Philips)
 Balança de precisão Pro 32/34F (Sartorius)
 Microondas Micro-Chef 2935N 900W (Moulinex)
 Câmara de fluxo laminar Classe II Tipo 2A (TradeLabor)
 Termociclador TPersonal Combi (Biometra)
 Tina de electroforese MultiSub Midi (Cleaver Scientific)
 Fonte de alimentação OmniPac Midi MP-250 (Cleaver Scientific)
 Transiluminador TCP-20.MC (Vilber Lourmat)
 Sistema de documentação e análise de electroforese EDAS 120 (Kodak Digital Science)

CONSUMÍVEIS

Luvas de látex descartáveis Ruthe, sem pó e não-estéreis (Top Glove)
 Luvas de nitrilo descartáveis DERMAGRIP, sem pó e não-estéreis (WRP)
 Pontas sem filtro autoclavadas 10, 200 e 1000 µl (vários fabricantes)
 Pontas com filtro DNase e RNase-free 10, 20, 100, 200 (Sarsted e Axygen) e 1000 µl (BioPlastics)
 Tubos de PCR 0,2 mL PurePak (Molecular BioProducts)
 Tubos de PCR 0,5 mL (Sorenson BioScience)
 Microtubos DNase e RNase-free 1,5 mL (Sarsted)
 Microtubos DNase e RNase-free 2,0 mL (Sarsted e BioPlastics)
 Tubos *Falcon* estéreis de 15 e 50 mL (Orange Scientific)
 Lâminas de bisturi estéreis 13 e 15 (B. Braun)

REAGENTES GENÉRICOS

Etanol absoluto P.A. (Panreac)
 Clorofórmio P.A. (Merck)
 Isopropanol P.A. (Merck)
 Fenol P.A. (Panreac)
 Álcool isoamílico P.A. (Merck)
 Acetato de sódio (Merck)
 SDS (Merck)
 Tampão TNE (base Tris, NaCl, EDTA e água ultra-pura)
 Tampão Tris HCl (base Tris, HCl e água ultra-pura)
 Tampão TBE (base Tris, ácido bórico, EDTA e água ultra-pura)

Água ultra-pura nuclease-free (Cleaver Scientific)

Água ultra-pura tratada com DEPC (Bioline)

Água ultra-pura Milli-Q autoclavada (Millipore)

AMOSTRAGEM DE ROEDORES

Os animais analisados foram capturados por especialistas em mamalogia entre Fevereiro e Agosto de 2010, com recurso a técnicas de armadilhagem, em três locais nas regiões Centro e Sul do país, tendo sido posteriormente identificados fenotipicamente ao nível da espécie. Após a sua captura, os roedores foram mantidos em cativeiro num biotério com vista, também, à condução de outros estudos. Refira-se ainda que quatro destes animais nasceram já em cativeiro (*vide* ANEXOS – TABELA 1).

A larga maioria dos roedores em estudo morreram de causas naturais ou desconhecidas (doença ou *stress* fisiológico), tendo apenas um sido sacrificado através de deslocamento da cervical, efectuado por um profissional autorizado.

Após a sua morte, na impossibilidade de serem logo processados, os cadáveres eram imediatamente conservados a -20 °C. Apenas dois animais foram processados a fresco (*i.e.*, logo após a morte). Os animais foram dissecados, procedendo-se à remoção de diversos órgãos: baço, cérebro ou coração, fígado, pulmão e rim. Estes órgãos foram alíquotados (três alíquotas por órgão) em microtubos de 1,5 mL e imediatamente conservados a -80 °C. Todos os órgãos foram analisados individualmente.

Para cada um dos animais foi ainda elaborada uma ficha de necrópsia.

EXTRACÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

RNA. A extracção de RNA foi efectuada com recurso ao reagente TRIpure (Bioline), a partir de amostras de baço, cérebro ou coração, pulmão e rim, bem como de algumas amostras de fígado.

Após a dissecação dos animais, num microtubo de 1,5 mL juntou-se 200 µl de TRIpure a uma alíquota com cerca de 25 – 50 mg de cada um dos órgãos acima referidos e homogeneizou-se por maceração, após o que se adicionou mais 600 µl de TRIpure. Estes homogeneizados foram armazenados a -80 °C, até serem efectivamente extraídos.

As amostras foram descongeladas, bem misturadas com auxílio do vórtex e deixadas a incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente. Juntou-se então 160 µl de clorofórmio a cada uma e agitou-se vigorosamente durante 15 segundos, seguindo-se uma outra incubação à temperatura ambiente, durante 3 minutos. Para terminar a separação das fases, as amostras foram centrifugadas a 4 °C e 12.000 x g durante 15 minutos.

O sobrenadante contendo o RNA (fase aquosa) foi então transferido para um novo microtubo. Para precipitar o RNA, juntou-se 400 µl de isopropanol e agitou-se vigorosamente durante 15 segundos. A mistura contendo o RNA e o isopropanol foi incubada durante 10 minutos

à temperatura ambiente, após o que se seguiu nova centrifugação a 4 °C e 12.000 x g durante outros 10 minutos (a partir deste passo, as amostras em repouso foram sempre colocadas em gelo).

Procedeu-se então à remoção do sobrenadante e à lavagem do *pellet* de RNA com 800 µl de etanol a 70%, vortexando bem e centrifugando a 4 °C e 7.500 x g durante 5 minutos. Novamente, rejeitou-se o sobrenadante e foram efectuadas mais duas lavagens com etanol a 70%, usando-se apenas 500 µl de etanol por amostra e por lavagem, e aumentando-se a velocidade de centrifugação para 12.000 x g (manteve-se a temperatura e tempo de centrifugação).

Após descartar o etanol a 70%, removeu-se o excesso com auxílio de uma micropipeta e secaram-se as amostras, centrifugando no SpeedVac durante 2 minutos sem aquecimento e colocando-as em gelo durante mais 5 minutos. Este passo foi repetido até que os *pellets* estivessem bem secos e hialinos. Finalmente, o RNA foi ressuspensão adicionando 100 µl de água ultra-pura tratada com DEPC a cada uma das amostras, incubando a 60 °C no bloco seco durante 10 minutos e pipetando *up-and-down* várias vezes.

As amostras de RNA assim extraído foram alíquotadas (três alíquotas de 10 µl e uma de 70 µl). As alíquotas de trabalho foram congeladas a -20 °C, enquanto que os *stocks* foram armazenados a -80 °C.

DNA. Para a obtenção de DNA a partir das amostras de fígado ou pulmão, foi efectuada uma extracção com fenol-clorofórmio.

Num microtubo de 2 mL, juntou-se 500 µl de tampão TNE 1x (pH 7,5), 60 µl de tampão Tris HCl 1M (pH 8,0), 16 µl de SDS a 20% e 2 µl de proteinase K (50 µg/µl) (Merck) a uma pequena porção de fígado ou pulmão (~ 20 mg), e agitou-se com o vórtex. Esta mistura foi deixada a incubar a 55 °C durante a noite.

Após verificar que as amostras se encontravam bem digeridas, adicionou-se 500 µl de fenol a cada uma delas, agitou-se por inversão durante 5 minutos, vortexou-se e centrifugou-se a 11.750 x g durante outros 5 minutos. O sobrenadante (~ 500 µl) foi então transferido para um novo microtubo, juntando-se 250 µl de fenol e 250 µl de uma mistura 24:1 de clorofórmio e álcool isoamílico. Seguiu-se nova agitação por inversão durante 5 minutos, agitação por vórtex e centrifugação a 11.750 x g durante 5 minutos. Mais uma vez, transferiu-se o sobrenadante (~ 500 µl) para um outro microtubo e adicionou-se 500 µl da mistura 24:1 de clorofórmio e álcool isoamílico. Agitou-se durante 5 minutos, vortexou-se e centrifugou-se a 11.750 x g durante 5 minutos.

O sobrenadante contendo o DNA (~ 300 µl) foi então transferido para um microtubo de 1,5 mL, e foi precipitado adicionando 30 µl de acetato de sódio 3M e 600 µl de etanol absoluto refrigerado, misturando por inversão e incubando a -20 °C durante, no mínimo, 1 hora.

As amostras precipitadas foram centrifugadas a 11.750 x g durante 20 minutos, após o que se rejeitou o sobrenadante, removendo o excesso de etanol com auxílio de uma micropipeta. Os *pellets* de DNA foram lavados com 20 µl de etanol a 70% e centrifugados a 11.750 x g durante 5 minutos. O excesso de etanol foi removido com uma micropipeta e os microtubos contendo as amostras foram deixados abertos durante algumas horas à temperatura ambiente, até que os *pellets*

estivessem secos. Finalmente, ressuspendeu-se o DNA em 200 μ l de água ultra-pura, agitando suavemente e pipetando *up-and-down* algumas vezes.

O DNA presente nas amostras foi quantificado com o NanoDrop, tendo sido feitas alíquotas de trabalho com um volume de 100 μ l e uma concentração final de DNA de 50 ng/ μ l, que foram preservadas a 4 °C. Os *stocks* foram armazenados a -20 °C.

RNA e DNA. Para além das duas metodologias já mencionadas, foi ainda ensaiado um *kit* comercial, o RTP DNA/RNA Virus Mini Kit (Invitek), que permitia a extracção simultânea de RNA e DNA virais. Foram utilizadas cinco amostras, uma de baço e quatro de fígado, de outros cinco animais e seguiram-se as instruções do fabricante, com algumas modificações.

Num tubo de extracção já fornecido, juntou-se 400 μ l de água ultra-pura a um fragmento de fígado ou baço com cerca de 10 mg e agitou-se ligeiramente com o vórtex. Os tubos foram então incubados no bloco seco a 65 °C durante 5 minutos, seguindo-se nova incubação no termoagitador orbital a 60 °C durante 15 minutos, com uma agitação constante a 200 rpm. Terminou-se com uma segunda incubação no bloco seco a 65 °C durante mais 5 minutos. Para aumentar a sensibilidade do *kit*, foi efectuada uma última incubação no bloco seco a 95 °C durante 10 minutos.

Para sedimentar o material que não foi lisado, as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g durante 1 minuto. O sobrenadante contendo os ácidos nucleicos foi transferido para um microtubo de 1,5 mL, no qual se adicionou 400 μ l da solução de ligação fornecida, misturando bem com auxílio da pipeta. As amostras foram então transferidas para o filtro RTA e respectivo tubo colector, ambos fornecidos, e centrifugadas a 8.150 x g durante 1 minuto. O tubo colector RTA foi descartado e substituído por um novo, e juntou-se 500 μ l do tampão de lavagem R1 fornecido ao filtro RTA, centrifugando a 8.150 x g durante 30 segundos. O tubo colector RTA foi novamente descartado e substituído por um novo, após o que se juntou 700 μ l do tampão de lavagem R2 fornecido ao filtro RTA e se centrifugou a 8.150 x g durante 30 segundos. O tubo colector RTA contendo o filtrado foi descartado e substituído uma última vez, procedendo-se a uma centrifugação a 16.000 x g durante 4 minutos, para remover qualquer quantidade residual de etanol presente no tampão de lavagem R2.

O tubo colector RTA foi descartado e substituído por um tubo de eluição fornecido. Finalmente, juntou-se 60 μ l do tampão de eluição R (pré-aquecido no bloco seco a 80 °C) directamente sobre a superfície do filtro RTA, mas sem tocar neste, e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 3 minutos e centrifugadas a 8.150 x g durante 1 minuto.

As amostras foram alíquotadas (três alíquotas de 10 μ l e uma de 30 μ l) e conservadas a -20 °C ou -80 °C, consoante se tratassem de alíquotas de trabalho ou de *stocks*, respectivamente.

AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

As misturas reaccionais e condições de amplificação usadas inicialmente foram as descritas na literatura, tendo sido posteriormente optimizadas para *primers*, enzimas e amostras específicas. Todas as misturas reaccionais foram preparadas numa câmara de segurança biológica de classe II,

tipo 2A. Em todas as reacções foi utilizado um controlo negativo, no qual o RNA ou DNA molde foi substituído por água ultra-pura, e, para a pesquisa de *Picornaviridae* e *Herpesviridae*, foram também utilizados controlos positivos (RNA do EMCV e DNA do vírus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1), respectivamente). Todos os potenciais resultados positivos obtidos utilizando os *primers* específicos para vírus foram confirmados com uma repetição da amplificação, a fim de averiguar a sua reprodutibilidade.

Na TABELA 2 dos ANEXOS encontram-se descritos os tipos de tecidos, por animal, em que os vírus das diversas famílias em estudo foram pesquisados.

TABELA 1. *Primers* utilizados neste estudo.

<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')	Polar.	Temp. hibrid. (°C)	Gene/ Região alvo	Organismo/ Vírus	Tam. amplificação (bp)	Referência
<i>Actin F</i>	GCTCCGGCATGTGCAA	+	55	β -actina	Roedores	541* 1082**	[101]
<i>Actin R</i>	AGGATCTTCATGAGGTAGT	–					
<i>S1</i>	GGMCAAGACAGCAGAYTGG	+	56	NP	<i>Bunyaviridae</i>	875 - 890	[102]
<i>S2</i>	AGCTCAGGATCCATRTCATC	–					
<i>AREN1+</i>	CWATRTANGGCCAICCTCICC	+	50			447	[69]
<i>AREN1–</i>	TNRWYAAYCARTTYGGIWCIRTGCC	–					
<i>AREN2+</i>	CANANYTTRTANARNAIRTTYTCRTAIGG	+	51	NP	<i>Arenaviridae</i>	194	
<i>AREN2–</i>	AGYYTNKNNGCNGCIGTIAARGC	–					
<i>Arena F</i>	GATGAGTCTTTCACATCCCA	+	50			547 - 571	Este trabalho
<i>Arena R</i>	GCACAGTGGATCCTAGGCA	–					
<i>MAMD</i>	AACATGATGGGRAARAGRGARAA	+	53	NS5		260 - 263	[103]
<i>cFD2</i>	GTGTCCCAGCCGCGGTGTCATCAGC	–					
<i>FS 778</i>	AARGGHAGYMGDCGCHATHTGCT	+	54 [†]		<i>Flaviviridae</i>	215 [†]	
<i>Flavi F</i>	AGTGAGAGTGGCGACGGGAA	+	55	NS5 3'-UTR		241 - 243	Este trabalho
<i>Flavi R</i>	GTGATGGTGGCTCAGGGAGA	–					
<i>EMCV F</i>	TGGTGTCTTTGGTGC GGCCC	+	57	CCR	<i>Picornaviridae</i>	478	Caeiro, com. pess.
<i>EMCV R</i>	TGTCTCGTGCCGGAGGCCAT	–					
<i>HV</i>	CGGAATTCTAGAYTTYGCNWSNYTNTAYCC	+	45	DNA pol.	<i>Herpesviridae</i>	450 - 800	[104]
<i>Cons lower</i>	CCCGAATTCAGATCTCNGTRTCNCCRTA	–					

* mRNA

** DNA

[†] Em conjunto com o *primer* cFD2

RT-PCR. A amplificação de RNA foi feita com recurso ao *kit* OneStep RT-PCR (Qiagen). Num tubo de PCR juntou-se 2,5 μ l de água ultra-pura RNase-free, 1 μ l de tampão OneStep RT-PCR 5x (contendo MgCl₂ a 12,5 mM), 0,2 μ l de mistura de dNTPs a 40 mM, 0,3 μ l de cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*) a 10 μ M, 0,2 μ l da mistura enzimática OneStep RT-PCR (contendo as transcriptases reversas Omniscript e Sensiscript, e a DNA polimerase HotStarTaq) e 0,5 μ l de

amostra contendo o RNA molde, para um volume final de 5 μ l. Esta mistura de reacção foi então submetida às seguintes condições de amplificação: 30 minutos a 50 °C para a transcrição reversa, 15 minutos a 95 °C para a inactivação das transcriptases reversas, activação da HotStarTaq e desnaturação do cDNA, seguindo-se 34 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94 °C), hibridação com os *primers* (30 segundos a 50 – 57 °C – *vide* TABELA 1) e polimerização do DNA (1 minuto a 72 °C), terminando-se com um passo final de polimerização a 72 °C durante 10 minutos.

Como controlo da qualidade do RNA presente nas amostras de baço, cérebro ou coração, pulmão e rim, foi usado um par de *primers*, Actin F e Actin R (TABELA 1), específico para uma região do gene da β -actina, uma proteína altamente conservada, presente no citosqueleto de todas as células eucariotas, cujos mRNAs são expressos constitutivamente.

Para a pesquisa de membros das quatro famílias virais em estudo com genoma de RNA foram usados os *primers* específicos S1 e S2 (*Bunyaviridae*), Arena F e Arena R (*Arenaviridae*), Flavi F e Flavi R (*Flaviviridae*) e EMCV F e EMCV R (*Picornaviridae*) (TABELA 1).

Os *primers* EMCV F e EMCV R foram desenhados tendo por base um isolado de referência do EMCV (ATCC VR-129B), cuja sequência parcial está depositada no GenBank (AJ617356.1). Já os *primers* Arena F, Arena R, Flavi F e Flavi R foram desenhados a partir de regiões conservadas identificadas em sequências *consensus*, obtidas através do alinhamento de sequências de diversos isolados de arena e flavivírus, respectivamente, também disponíveis nessa mesma base de dados. Todos estes *primers* foram desenhados e analisados com recurso à ferramenta Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

PCR. Para amplificar o DNA presente nas amostras, num tubo de PCR juntou-se 10,75 ou 21,75 μ l de água ultra-pura, 5 ou 10 μ l de tampão GoTaq Flexi 5x, 1,5 ou 3 μ l de $MgCl_2$ a 25 mM, 0,5 ou 1 μ l da mistura de dNTPs a 40 mM, 2,5 ou 5 μ l de cada um dos *primers* a 10 μ M, 0,25 μ l de DNA polimerase GoTaq a 5 U/ μ l (Promega) e 2 ou 4 μ l de DNA molde, perfazendo um volume total de 25 ou 50 μ l, respectivamente.

No caso da β -actina (*primers* Actin F e Actin R), as misturas foram sujeitas a uma desnaturação inicial durante 2 minutos a 95 °C; seguindo-se 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C e 1 minuto a 72 °C; e terminando com uma extensão final de 5 minutos a 72 °C.

Para a pesquisa de herpesvírus (*primers* HV e Cons lower – TABELA 1), as misturas foram por sua vez sujeitas a uma desnaturação inicial de 2 minutos a 95 °C; seguindo-se 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 45 °C e 1 minuto a 72 °C; e terminando com uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. Paralelamente, foi também ensaído um *touch-down* PCR com algumas amostras, em que as misturas foram sujeitas, para além da desnaturação inicial e elongação final, a cinco séries de dois ciclos, em que a temperatura de *annealing* foi progressivamente diminuída, com uma redução de 2 °C de série para série, desde os 55 °C (primeira série) até aos 47 °C (quinta série), seguindo-se 25 ciclos com uma temperatura de *annealing* de 45 °C.

Adicionalmente, e apenas para algumas amostras seleccionadas, com vista à obtenção de maior quantidade de produto de amplificação com os *primers* EMCV F e EMCV R, foi efectuado uma segunda reacção de PCR, tendo como molde o produto do RT-PCR inicial. As condições de

reacção foram idênticas às aquelas usadas com os *primers* específicos para a β -actina, alterando-se apenas a temperatura de hibridação dos *primers* (57 °C neste caso).

Nested e heminested PCR. Para a pesquisa de arnavírus e de flavivírus, foram ainda utilizadas metodologias *nested* e *heminested* PCR, respectivamente. As misturas reacionais usadas para o RT-PCR inicial foram já descritas no capítulo RT-PCR, enquanto que as usadas para o *nested* PCR encontram-se referidas no capítulo PCR.

Num primeiro RT-PCR, as misturas foram submetidas a uma transcrição reversa de 30 minutos a 50 °C; a uma desnaturação inicial de 15 minutos a 95 °C; seguindo-se 25 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 50 ou 53 °C (*vide* TABELA 1) e 1 minuto a 72 °C; e terminando com uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Seguiu-se um *nested* PCR, em que as misturas – contendo como molde o DNA anteriormente amplificado – foram sujeitas a uma desnaturação inicial de 2 minutos a 95 °C; seguindo-se 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 51 ou 54 °C (*vide* TABELA 1) e 1 minuto a 72 °C; e terminando com uma extensão final de 5 minutos a 72 °C.

No caso dos *Arenaviridae*, foram usados os *primers* externos AREN1+ e AREN1-, e os *primers* internos AREN2+ e AREN2-, enquanto que para os *Flaviviridae* usaram-se os *primers* externos MAMD e cFD2, e o *primer* interno FS 778 (TABELA 1).

ELECTROFORESE EM GEL DAS AMOSTRAS EXTRAÍDAS E DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Para averiguar o sucesso das extracções de RNA e/ou DNA total, bem como da amplificação dos ácidos nucleicos por RT-PCR e/ou PCR, todas as amostras e produtos foram submetidos a uma electroforese em gel de agarose.

Foram preparadas soluções de agarose a 0,7 ou 1,5%, juntando TBE 1x, agarose UltraPure (Invitrogen) e 2,5 μ l de brometo de etídio a 10 mg/mL (Sigma-Aldrich), para perfazer um volume final de ~ 50 mL. Adicionou-se tampão de arrastamento (concentração final 1x) a cada uma das amostras ou produtos, que foram então aplicados no gel e sujeitos a uma corrente eléctrica de 70 mA, em TBE 1x. Foram usados os marcadores de massa molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) e Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

Após a migração electroforética, os géis foram fotografados com uma câmara DC120 Zoom Digital (Kodak Digital Science), e as imagens obtidas posteriormente analisadas com recurso ao *software* 1D v. 2.0.3 (Kodak Digital Science).

EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA A PARTIR DE GÉIS DE AGAROSE

No caso dos produtos de RT-PCR ou PCR exibirem múltiplas bandas, procedeu-se à excisão da(s) banda(s) que apresentasse(m) um comprimento idêntico ao esperado. Os fragmentos de gel contendo o DNA de interesse foram então purificados com o *kit* PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

Os fragmentos de gel excisados foram pesados e colocados em microtubos de 2,0 mL, nos quais se juntaram 3 volumes de tampão de solubilização de gel L3 por cada volume de gel. Estas misturas foram incubadas no bloco seco a 50 °C durante 10 minutos, agitando os tubos por inversão a cada 3 minutos, até que a agarose estivesse bem dissolvida, seguindo-se uma nova incubação à mesma temperatura durante mais 5 minutos. Para aumentar o rendimento da purificação, juntou-se 1 volume de isopropanol por cada volume de gel e agitou-se bem. As misturas foram transferidas para uma coluna PureLink e respectivo tubo de lavagem, pipetando directamente sobre o centro da coluna, e centrifugadas a 13.800 x g durante 1 minuto. O líquido colectado no tubo de lavagem foi descartado, após o que se voltou a colocar a coluna no tubo. Juntou-se então 600 µl de tampão de lavagem W1 (contendo etanol) à coluna, centrifugou-se a 13.800 x g durante 1 minuto, descartou-se o líquido colectado e voltou-se a colocar a coluna no tubo. Para remover qualquer quantidade residual de tampão de lavagem e etanol, fez-se uma centrifugação à 16.000 x g durante 3 minutos. O tubo de lavagem foi então descartado e substituído por um tubo de eluição. Finalmente, juntou-se 50 µl de tampão de eluição E1, pipetando sobre o centro da coluna, incubou-se 1 minuto à temperatura ambiente, centrifugou-se a 13.800 x g durante 1 minuto e descartou-se a coluna.

O DNA assim obtido e purificado foi então reamplificado, com vista à sua sequenciação.

PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAÇÃO

Todos os produtos de RT-PCR e PCR que apresentassem bandas de interesse foram purificados e sequenciados. Para a purificação foram usadas duas metodologias distintas: um método enzimático e um outro de purificação em colunas.

No primeiro, a 20 µl do produto adicionou-se 0,5 µl de Exonuclease I a 20 U/µl (Fermentas), 1 µl de fosfatase alcalina termosensível FastAP a 1 U/µl (Fermentas) e 2,5 µl de tampão FastAP 10x. Esta mistura foi então incubada a 37 °C durante 15 minutos, e a reacção foi terminada com uma segunda incubação a 85 °C durante 15 minutos.

Já para o segundo método de purificação, utilizou-se novamente o *kit* PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Adicionou-se 200 µl de tampão de ligação B2 a 50 µl do produto e misturou-se bem. A mistura foi então transferida para uma coluna PureLink e respectivo tubo de lavagem, e centrifugada a 13.800 x g durante 1 minuto. Descartou-se o líquido colectado e voltou-se a colocar a coluna no tubo de lavagem. Foram então adicionados 650 µl de tampão de lavagem W1 à coluna, e procedeu-se como referido anteriormente para a purificação de DNA a partir de bandas em géis de agarose, com excepção do último passo, em que a velocidade de centrifugação utilizada foi de 16.000 x g.

Os produtos purificados através destes métodos foram então enviados para os serviços de sequenciação da MacroGen ou da StabVida. As sequências obtidas foram analisadas, editadas e alinhadas com recurso ao *software* BioEdit v. 7.0.9 (Ibis Biosciences), e identificadas por meio de um BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [105].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ROEDORES

Foram processados e analisados 34 roedores no total, pertencentes a quatro espécies, três géneros e duas famílias (*Cricetidae* e *Muridae*) da ordem *Rodentia*. Destes, 32,4% (n = 11) pertenciam à espécie *Microtus duodecimcostatus*, 35,3% (n = 12) à espécie *Microtus lusitanicus*, 29,4% (n = 10) à espécie *Apodemus sylvaticus* e 2,9% (n = 1) à espécie *Mus spretus*.

CONTROLO DA QUALIDADE DOS ÁCIDOS NUCLEICOS PRESENTES NAS AMOSTRAS

Uma vez que se optou por não usar controlos positivos para três das quatro famílias virais em estudo com genoma de RNA, houve necessidade de aferir a qualidade do RNA total existente nas amostras extraídas, com recurso a um marcador molecular presente em todas as amostras de RNA dos animais estudados, a fim de certificar que a não amplificação aquando do uso de *primers* específicos para vírus se tratava, de facto, de um verdadeiro resultado negativo, e não de uma não amplificação devida a ausência de RNA molde de qualidade.

Com essa finalidade, e assumindo que o RNA viral apresenta estruturas secundárias que lhe conferem uma maior resistência à degradação relativamente ao mRNA celular, foi seleccionado um par de *primers* que amplificasse especificamente o mRNA da β -actina, um gene constitutivo e altamente conservado, presente em todas as células eucariotas.

Os *primers* Actin F e Actin R descritos por Wang *et al.* [101] adequavam-se a este propósito, e, após um alinhamento com o Primer-BLAST, verificou-se que estes flanqueavam um segmento de 1082 bp do gene da β -actina de *Mus musculus*, bem como um outro com 541 bp do mRNA da β -actina desse mesmo roedor. Ou seja, o fragmento de DNA amplificado por estes *primers* contém, pelo menos, um intrão, o que é de extrema utilidade, pois também permite distinguir entre um produto de PCR e um produto de RT-PCR.

De facto, as amostras amplificadas por RT-PCR com estes *primers* exibiam uma banda com um comprimento na ordem dos 541 bp. Concomitantemente, e para verificar a diferença entre os produtos obtidos por RT-PCR e aqueles obtidos por PCR, foram seleccionadas algumas amostras, que seriam também submetidas a um PCR com os *primers* Actin F e Actin R. Na FIGURA 1 pode-se observar que, contrariamente ao esperado, as amostras amplificadas por PCR originam um produto de tamanho idêntico ao obtido por RT-PCR. Nas amostras Mi1, Mu1 e A4 em particular pode-se ainda observar a presença de duas outras bandas ténues, ambas com comprimentos próximos dos 1000 pb, podendo possivelmente a maior delas tratar-se do amplicão da β -actina esperado.

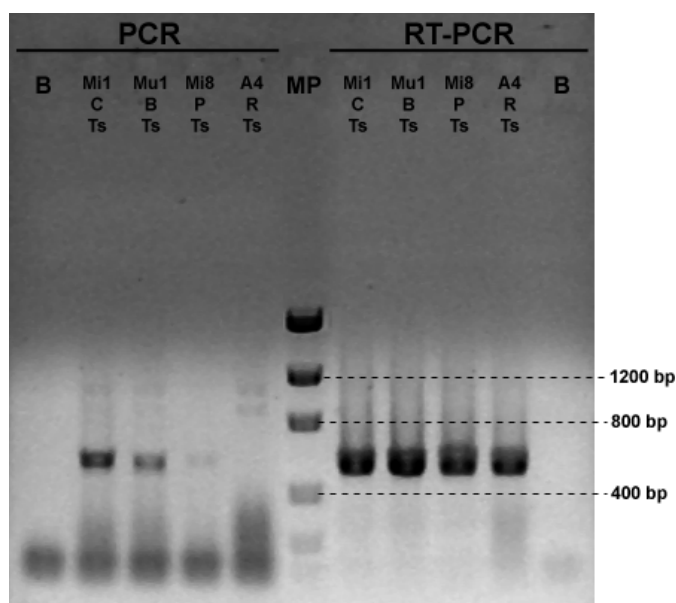


FIGURA 1. Electroforese de produtos de PCR e de RT-PCR, obtidos com os *primers* Actin F e Actin R. C: cérebro; B: baço; P: pulmão; R: rim; Ts: extracção com TRIsure; B: controlo negativo; MP: marcador de massa molecular.

Para tentar clarificar este resultado, foi realizada uma outra experiência, em que dois grupos com as mesmas amostras (as do ensaio anterior, à excepção da amostra Mu1) foram submetidos a um novo RT-PCR. O primeiro grupo (que incluía o controlo negativo) foi colocado no termociclador no início do programa, enquanto que o segundo grupo só foi colocado já a 95°C, *i.e.* após os 30 minutos iniciais, correspondentes ao passo de transcrição reversa. Desta forma, pretendia-se que este último grupo fosse sujeito apenas a um PCR convencional, mas usando o *kit* OneStep RT-PCR. Na FIGURA 2 verifica-se que todas as amostras do grupo A (RT-PCR) amplificaram, enquanto que, no grupo B (PCR), apenas a amostra Mi1 amplificou, não exibindo bandas múltiplas.

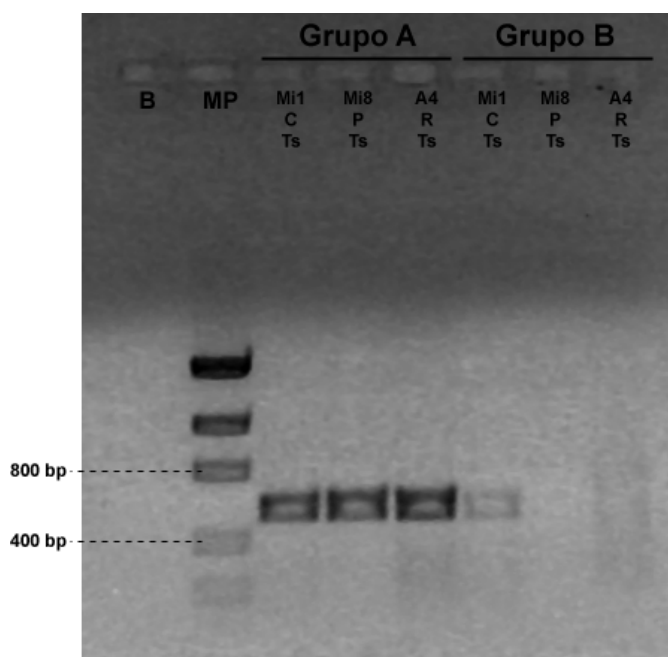


FIGURA 2. Electroforese de produtos obtidos com o *kit* OneStep RT-PCR, usando os *primers* Actin F e Actin R. C: cérebro; P: pulmão; R: rim; Ts: extracção com TRIsure; B: controlo negativo; MP: marcador de massa molecular.

A análise conjunta das FIGURAS 1 e 2 permite supor que as amostras extraídas com o reagente TRIsure possuem RNA amplificável de boa qualidade e que, tal como já tinha sido verificado por Dias [106], contêm também quantidades amplificáveis de DNA, o que é de extrema utilidade em estudos desta natureza, nos quais se rastreiam não só vírus com genoma de RNA, como também vírus com genoma de DNA. Estes resultados parecem igualmente indicar que o *kit* OneStep RT-PCR estará de facto optimizado para RT-PCR, amplificando selectivamente o RNA presente nas amostras em detrimento do DNA, e que apenas funcionará como um PCR convencional caso as amostras contenham uma quantidade muito considerável de DNA de boa qualidade. Esta conclusão é suportada pelo comportamento da amostra Mi1 em particular, a única que amplificou em todas as situações.

Adicionalmente, pode-se verificar a partir destes resultados que o *kit* OneStep RT-PCR, para além de elevada sensibilidade e especificidade, apresenta também um alto rendimento, pois, partindo de misturas reaccionais de 5 μ l contendo apenas 0,5 μ l de RNA molde, permite amplificar um produto específico e em grande quantidade, com uma redução muito significativa das quantidades recomendadas pelo fabricante (no caso, 10x, já que o volume final recomendado por reacção era de 50 μ l). Mais uma vez, este facto é muito útil para estudos de rastreio, em que é necessário processar uma série de amostras com o máximo de economia possível.

Ainda assim, os resultados obtidos não foram satisfatórios, pois não permitiam explicar porque se obtinha uma banda com cerca de 541 bp por PCR, usando os *primers* para a β -actina. Com essa finalidade, seleccionaram-se cinco amostras (coração e pulmão dos animais Mi8 e Mi9, e pulmão do animal Mu1), que foram amplificadas, tanto por RT-PCR como por PCR, purificadas e sequenciadas. Das 10 amostras enviadas, quatro não produziram sequências utilizáveis (ambas as amostras Mu1 amplificadas por RT-PCR ou PCR, e as amostras de coração e pulmão Mi8 amplificadas por PCR). Foi efectuado um BLAST para cada uma das seis sequências restantes.

Verificou-se então que as amostras amplificadas por RT-PCR apresentavam, de facto, percentagens de identidade muito elevadas, na ordem dos 91 a 98%, relativamente a sequências de mRNA da β -actina de diversas espécies de roedores, enquanto que aquelas obtidas por PCR, apresentavam percentagens de identidade de 94 a 95%, relativamente a sequências de mRNA da γ -actina de *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*, o que parece indicar que estes *primers*, quando usados num PCR convencional, flanquearão uma região de um pseudogene da γ -actina. A título de exemplo, a sequência obtida por RT-PCR que exibia uma maior homologia global após o alinhamento com o BLAST (amostra de coração Mi8) apresentava, para uma percentagem de cobertura de 100%, uma identidade máxima de 95% (518/543 nt) relativamente a uma sequência da β -actina de *Myodes glareolus* (HM107871.1). Por PCR, a amostra de pulmão Mi9 apresentava, também para uma cobertura de 100%, uma identidade máxima de 95% (500/524 nt) com uma sequência da γ -actina de *M. musculus* (NM_009609.2).

Assim, conclui-se que os *primers* Actin F e Actin R não são específicos para a β -actina, particularmente quando sujeitos a um PCR convencional, podendo também amplificar outros genes pertencentes à mesma família. A razão pela qual estes *primers* apresentam diferentes

afinidades consoante submetidos a RT-PCR ou PCR é desconhecida. Uma explicação possível prende-se com o facto da β -actina ser uma das proteínas celulares mais abundantes nos tecidos não musculares de mamíferos [107], o que implica uma elevada expressão génica, consequente transcrição de mRNA e, logicamente, a hibridação preferencial destes *primers* com a β -actina, quando sujeitos a RT-PCR. No caso de um PCR convencional, poder-se-á presumir que os *primers* estarão a hibridar com um pseudogene da γ -actina com múltiplas cópias, uma vez que se estima que o genoma do rato contenha 15 a 50 cópias de pseudogenes das actinas citosqueléticas (isoformas β e γ) [108].

Perante estes resultados, considerou-se existirem evidências robustas que permitiam afirmar que os *primers* Actin F e Actin R estavam de facto a amplificar mRNA da β -actina, quando submetidos a uma reacção de RT-PCR, pelo que foi então efectuado o controlo de qualidade do RNA em todas as amostras, utilizando estes *primers*.

Na TABELA 2 pode-se observar uma súmula destes resultados. Assim, verifica-se que 80,5% ($n = 120$) das amostras apresentaram um resultado positivo quando submetidas a RT-PCR para a β -actina, *i.e.*, produziram um amplicão com o comprimento esperado de 541 bp. Por oposição, em 19,5% ($n = 29$) das amostras não houve qualquer amplificação específica, sendo que, para três dos animais analisados, não se obteve amplificação em nenhuma das amostras dos diferentes órgãos. Estes três animais, bem como as restantes amostras negativas, não foram assim utilizados para a pesquisa de vírus, exceptuando, por motivos óbvios, aqueles pertencentes à família *Herpesviridae*.

Adicionalmente, o resultado positivo obtido para a amostra de baço do roedor Mi1, que tinha sido extraída utilizando o *kit* RTP, indica que este *kit* comercial não só extrai ácidos nucleicos virais, como também ácidos nucleicos celulares.

Após migração electroforética, as amostras de RNA ou DNA total exibiam, regra geral, bandas discretas (resultados não apresentados), o que também permitiu confirmar a presença de ácidos nucleicos em suspensão. Refira-se apenas que não houve qualquer cuidado específico adicional aquando da electroforese de amostras contendo RNA total (*i.e.*, estas processaram-se como se de uma vulgar electroforese de DNA se tratasse, não tendo sido utilizado tampão MOPS nem géis desnaturantes), pelo que as amostras terão sofrido alguma degradação durante este processo.

As amostras de DNA total não foram sujeitas a nenhum controlo de qualidade específico, uma vez que já tinham sido quantificadas, e a utilização de um controlo positivo para a pesquisa de herpesvírus permitiu excluir a má optimização da reacção de amplificação ou a ausência de ligação aos *primers* como causas de um resultado negativo.

TABELA 2. Resultados obtidos por RT-PCR das amostras dos diferentes órgãos, usando os *primers* Actin F e Actin R, por roedor.

ID roedor	Baço	Cérebro/ Coração	Fígado	Pulmão	Rim
Mi1	+	+	+	+	+
Mi2	+	+	+	+	+
Mi3	+	+	+	+	+
Mi4	+	+	+	+	+
Mi5	+	+	+	+	+
Mi6	+	+	+	+	+
Mi7	NE	+	NE	+	NE
Mi8	+	+	–	+	+
Mi9	+	+	+	+	+
Mi10	+	+	+	+	+
Mi11	+	+	+	+	+
Mi12	+	+	+	+	–
Mi13	+	+	NE	+	–
Mi14	+	+	NE	+	–
Mi15	–	+	NE	+	+
Mi16	+	+	NE	+	+
Mi17	+	+	NE	–	–
Mi18	–	+	NE	+	–
Mi19	+	+	NE	+	+
Mi20	+	+	NE	+	+
Mi21	+	+	NE	+	+
Mi22	+	+	NE	+	+
Mi23	+	+	NE	+	+
A1	+	+	+	+	–
A3	–	+	–	+	–
A4	+	+	–	+	+
A6	+	+	NE	+	+
A7	+	+	NE	+	–
A8	+	+	NE	+	+
A9	–	+	NE	+	–
A10	–	–	NE	–	–
A11	–	–	NE	–	–
A12	–	–	NE	–	–
Mu1	+	+	+	+	+

+: Positivo (houve amplificação)

–: Negativo (não houve amplificação)

NE: Não efectuada (amostra inexistente ou extraída com fenol-clorofórmio/*kit* RTP e apenas usada para PCR)

RASTREIO VIROLÓGICO

Bunyaviridae. A pesquisa de *Bunyaviridae*, género *Hantavirus* em particular, foi feita com recurso aos *primers* degenerados S1 e S2, desenhados por Sibold *et al.* [102; 109] a partir de regiões conservadas nos genes NP de todos os serótipos de hantavírus, por forma a hibridarem com todas as sequências hantavirais conhecidas.

Das 31 amostras testadas, apenas a Mu1 amplificou, exibindo uma banda com um comprimento na ordem dos 650 bp. Embora menor que o esperado (875 – 890 bp), podendo tratar-se de uma nova espécie viral, este produto foi purificado e enviado para sequenciação. Assim, obteve-se uma sequência com 603 bp que, por meio de um BLAST, revelou, para uma percentagem de cobertura de 98%, 99% (589/592 nt) de identidade máxima relativamente a um segmento de mRNA de um gene homólogo da DnaJ (Hsp40), subfamília A, membro 4, de *M. musculus* (NM_021422.4), tratando-se, como tal, de uma amplificação inespecífica e um falso positivo.

Como já foi referido, todas as restantes amostras apresentaram um resultado negativo. De facto, a incidência de infecções humanas causadas por hantavírus na Europa é, regra geral, baixa. Em Portugal, é apontada uma seroprevalência de 1% [27; 30], pelo que será expectável que a prevalência destes vírus nos seus reservatórios naturais seja, também ela, baixa.

Arenaviridae. Para a pesquisa de *Arenaviridae*, género *Arenavirus* em particular, foram utilizados os *primers* degenerados AREN1+ e AREN1- numa primeira reacção de RT-PCR, e os *primers*, também degenerados, AREN2+ e AREN2- para um *nested* PCR, desenhados por Ledesma *et al.* [69], tendo como base motivos conservados do gene NP, e com a capacidade para detectarem arenavírus pertencentes tanto ao complexo Lassa-LCMV, como ao complexo Tacaribe. Adicionalmente, foram também usados os *primers* específicos Arena F e Arena R, desenhados propositadamente para este trabalho.

Todas as amostras analisadas apresentaram um resultado negativo para qualquer um destes conjuntos de *primers*, *i.e.* não amplificaram, pelo que se excluiu a presença de arenavírus nos animais amostrados. Novamente, a seroprevalência destes vírus, e do LCMV em particular, nos países europeus é relativamente baixa, variando entre os 3,6 e os 16,3%, sendo que, em Espanha, se identificaram valores na ordem dos 3,8% [69].

Refira-se ainda que, uma vez que os *primers* Arena F e Arena R nunca tinham sido testados anteriormente, seria interessante, de futuro, ensaiá-los com diversas estirpes e espécies de arenavírus, a fim de averiguar a sua eficiência.

Flaviviridae. A detecção de *Flaviviridae*, género *Flavivirus* em particular, foi feita recorrendo aos *primers* *consensus* MAMD, cFD2 e FS 778 (para uma reacção de *heminested* PCR), desenhados por Scaramozzino *et al.* [103] com base no alinhamento de sequências do gene NS5 de 30 flavivírus diferentes, bem como aos *primers* Flavi F e Flavi R, desenhados especificamente para este estudo.

Todas as amostras amplificaram por *heminested* PCR, exibindo um perfil de bandas (FIGURA 3). Sete destas amostras apresentavam bandas com um comprimento próximo dos 215 bp (Mi3,

Mi9, Mi17, Mi18, Mi20, A6 e A9), das quais apenas duas (Mi9 e A9) conseguiram ser eficazmente extraídas, purificadas e reamplificadas, por forma a serem sequenciadas. Após sequenciação, verificou-se que os produtos apresentavam uma fraca qualidade, muito provavelmente devido à acumulação de erros introduzidos pela DNA polimerase após amplificações sucessivas, pelo que não foi possível alinhar satisfatoriamente as sequências *forward* e *reverse* de nenhuma das duas amostras. Ainda assim, conseguiu-se efectuar um BLAST para cada uma das quatro sequências obtidas em separado.

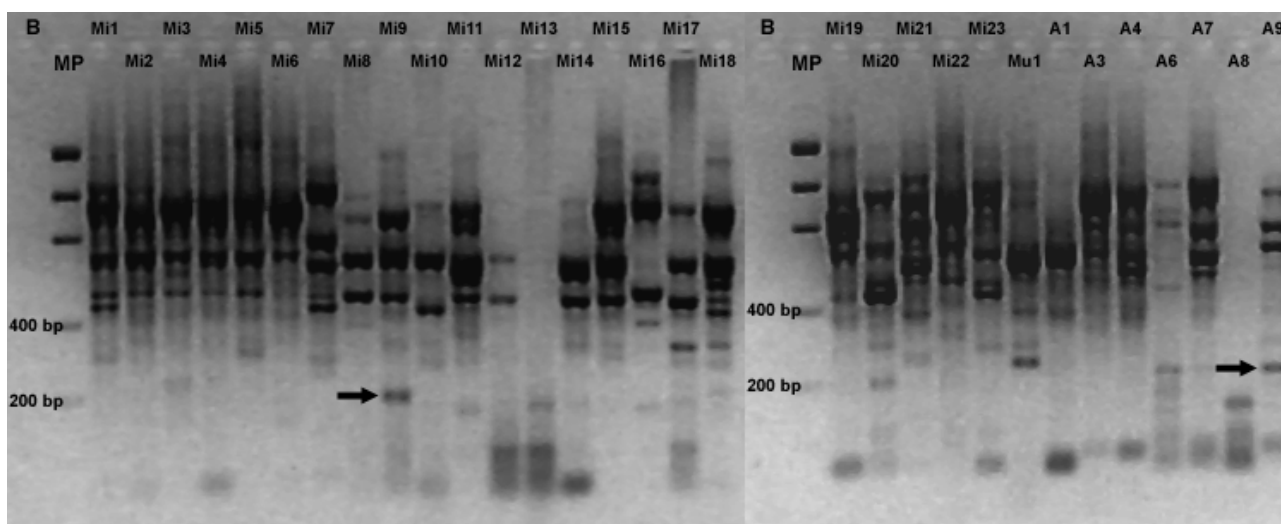


FIGURA 3. Electroforese de produtos de *heminested* PCR, obtidos com os *primers* MAMD, cFD2 e FS 778. As setas assinalam as bandas que foram enviadas para sequenciação. B: controlo negativo; MP: marcador de massa molecular.

Para o animal Mi9, com o *primer* FS 778 obteve-se, para uma cobertura de 95% em 100 nt, uma identidade máxima de 89% (73/82 nt) relativamente a uma sequência de *Acidovorax ebreus*, estirpe TPSY (CP001392.1), enquanto que com o *primer* cFD2, para uma cobertura de 80% em 100 nt, se obteve uma identidade máxima de 82% (66/80 nt) relativamente à mesma sequência de *A. ebreus*. As bactérias do género *Acidovorax* (β -proteobacteria, Comamonadaceae) são microorganismos Gram-negativos desnitrificantes, presentes em águas e solos geralmente contaminados. A sua possível detecção neste animal não terá significado patológico, uma vez que a estirpe TPSY de *A. ebreus* em particular não apresenta potencial patogénico [110], devendo-se antes a uma provável contaminação natural, dado que estes animais têm hábitos fossadores.

Quanto ao animal A9, com o *primer* FS 778 obteve-se, para uma cobertura de 76% em 127 nt, uma identidade máxima de 80% (78/97 nt) com um segmento do cromossoma 5 de *Mus musculus* (AC116500.13), enquanto que com o *primer* cFD2 se obteve, para uma cobertura de 85% em 124 nt, uma identidade máxima de 81% (86/106 nt) com essa mesma sequência de *M. musculus*.

Assim, verifica-se que este conjunto *primers* não é específico para flavivírus, uma vez que também amplifica contaminantes bacterianos e material genético dos próprios animais, sendo que essa inespecificidade estará provavelmente a ocorrer em maior escala durante a segunda reacção de PCR (resultados não apresentados). Refira-se ainda que estes *primers* foram apenas testados com sucesso *in vitro*, em estirpes virais obtidas a partir de cérebros de roedores infectados e

propagadas em células Vero [103], concluindo-se agora que não serão os mais adequados para a detecção de vírus em amostras providas da Natureza.

Concomitantemente, nenhuma das amostras exibiu um resultado positivo, quando amplificadas com os *primers* Flavi F e Flavi R. Mas, mais uma vez, será conveniente ensaiar estes *primers* com controlos positivos, por forma a verificar a sua especificidade e eficiência.

Picornaviridae. A pesquisa de picornavírus foi feita com recurso aos *primers* EMCV F e EMCV R, específicos para a estirpe de referência do EMCV da ATCC, com a referência VR-129B.

Apenas duas das amostras analisadas amplificaram. Uma delas, Mi16, apresentando duas bandas com tamanhos próximos dos 350 e 750 bp, resultado que não se conseguiu replicar, sendo como tal considerado um falso positivo. Já a amostra Mi7 – um *Microtus lusitanicus* capturado em Portalegre – exibiu uma banda com um comprimento idêntico ao esperado (478 bp) (FIGURA 4a). De modo a confirmar este resultado foi realizado um novo RT-PCR, seguido de um PCR convencional, que incluiu, para além da amostra de coração, uma amostra de pulmão do mesmo animal. Voltou então a verificar-se a existência de uma banda com cerca de 478 bp, sendo que, no pulmão, verificou-se ainda a presença de bandas múltiplas, que poderão indiciar a presença de genomas virais replicativos, significando que o vírus se estará a replicar activamente no tecido pulmonar. As bandas com um comprimento inferior a 478 bp poderão inclusivamente corresponder a partículas virais defectivas (FIGURA 4b).

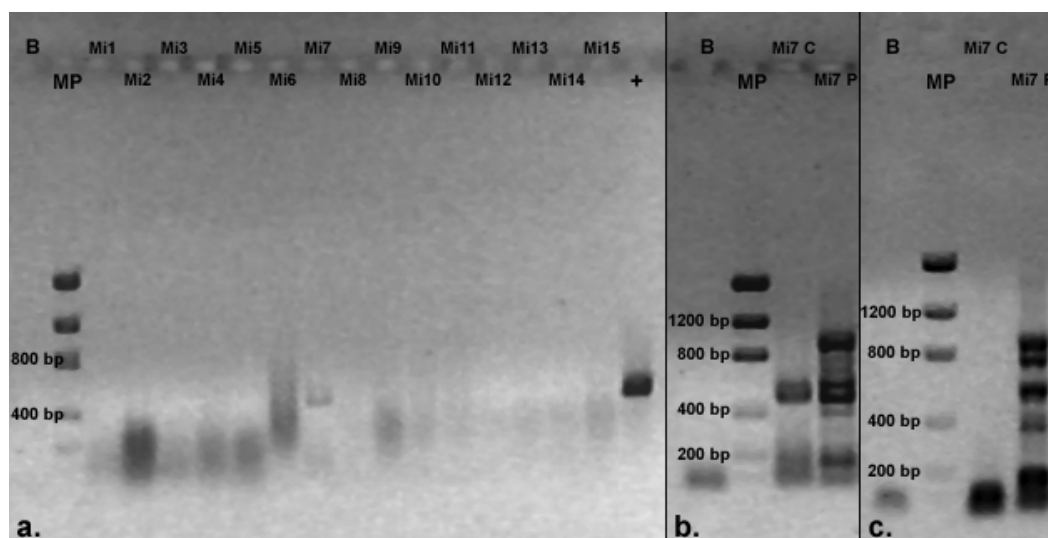


FIGURA 4. Electroforese de produtos de amplificação, obtidos com os *primers* EMCV F e EMCV R. a. Por RT-PCR; b. Por RT-PCR + PCR; c. Por RT-PCR + PCR, a partir de amostras extraídas de novo. C: coração; P: pulmão; B: controlo negativo; MP: marcador de massa molecular; +: controlo positivo.

Desta forma, o produto de amplificação obtido a partir da amostra de coração foi purificado e sequenciado, tendo-se obtido um segmento genómico com 468 bp, que apresentava, para uma cobertura de 100%, uma identidade máxima também de 100% (468/468 nt) relativamente a duas estirpes do EMCV, BEL-2887A/91 (AF356822.1) e ATCC VR-129B (AJ617356.1), respectivamente, sendo que esta última corresponde ao isolado usado como controlo

positivo. Ainda que estes *primers* amplifiquem uma região particularmente conservada do genoma viral, já que apresentam apenas um nucleótido de diferença relativamente a cinco outras estirpes de EMCV, e apenas dois nucleótidos relativamente a outras cinco (*vide* ANEXOS – FIGURA 1), ter-se-á que considerar a possibilidade de contaminação laboratorial.

Assim, foi efectuada uma nova extracção de RNA a partir de alíquotas *stock* de coração e pulmão do animal Mi7, alíquotas essas que nunca foram manipuladas em simultâneo com o controlo positivo. Após uma reacção de RT-PCR seguida de um PCR, verificou-se que a amostra de coração não apresentava amplificação, talvez devido à extracção a partir de uma porção de tecido cardíaco não infectado ou à degradação do RNA viral, enquanto que o pulmão continuava a exibir um perfil de bandas idêntico ao obtido anteriormente (FIGURA 4c). Foram então excisadas quatro dessas bandas (~ 400 bp, ~ 600 bp, ~ 800 bp e ~ 1000 bp) e tentou-se a sua reamplificação, mas sem sucesso, o que impossibilitou a sequenciação.

Não foi assim possível esclarecer em definitivo a existência ou não de contaminação das amostras do animal Mi7 inicialmente extraídas. Futuramente, tentar-se-á clarificar esta questão com recurso a outras técnicas moleculares (*e.g.* *Northern blot* e *slot blot*).

Herpesviridae. Para a detecção de herpesvírus utilizaram-se os *primers* degenerados HV e Cons lower, desenhados por Hanson *et al.* [104] com base em regiões conservadas, identificadas através do alinhamento de sequências para o gene da polimerase de DNA de diversos vírus animais com genoma de DNA.

Conforme esperado, todas as amostras amplificaram, exibindo um padrão de bandas relativamente uniforme, pelo que se procuraram as amostras que apresentassem bandas fora deste padrão, com comprimentos entre os 450 e os 800 bp. Com efeito, foram encontrados dois animais nesta situação, Mi16 e Mi21. Para clarificar estes resultados, tentando aumentar a especificidade da reacção, ensaiou-se também um protocolo de *touch-down* PCR com estas duas amostras, mas sem sucesso, uma vez que a amplificação foi muito fraca.

Procedeu-se assim à excisão de várias bandas, localizadas entre os 400 e 850 bp, de ambas as amostras Mi16 e Mi21, tendo-se conseguido a reamplificação em apenas duas delas (FIGURA 5), que foram então sequenciadas.

Verificou-se que os produtos sequenciados apresentavam fraca qualidade, não se tendo conseguido inclusivamente obter uma sequência *reverse* para a amostra Mi16. Contudo, após uma análise por BLAST das sequências *forward* e *reverse* individualmente, verificou-se que a amostra Mi16 em conjunto com o *primer* HV exibia, para uma cobertura de 95% em 447 nt, uma correspondência de 81% (348/427 nt) com uma sequência da fosfolipase A1 de *Salmonella enterica*, (CP001127.1). Já a amostra Mi21 exibia, em conjunto com o *primer* HV e para uma cobertura de 94% em 260 nt, uma correspondência de 86% com a DNA polimerase de *Enterobacter cloacae* (CP002272.1), enquanto que, com o *primer* Cons lower e para uma percentagem de cobertura de 95% em 255 nt, apresentava uma correspondência de 79% (194/244 nt) com essa mesma sequência bacteriana. A presença de enterobacteriáceas no fígado destes animais poderá, no caso de *E. cloacae*, ser resultado de uma contaminação intestinal, enquanto que, para *S. enterica*, caso não se

trate de uma contaminação intestinal ou de uma colonização assintomática, poderá indicar uma situação de bacteriemia e possível causa de morte.

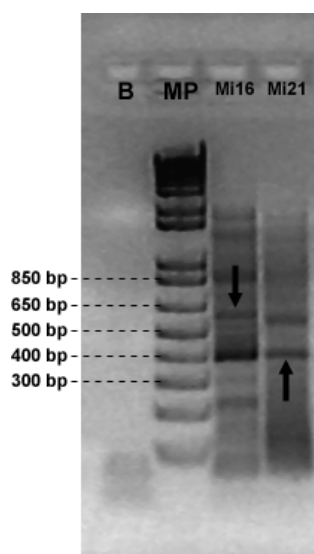


FIGURA 5. Electroforese de dois produtos de PCR, provenientes da amplificação com os primers HV e Cons lower de amostras de DNA extraído de fígado com fenol-clorofórmio. As setas assinalam as bandas que foram enviadas para sequenciação. B: controlo negativo; MP: marcador de massa molecular.

Segundo Hanson *et al.* [104], os *primers* HV e Cons lower apresentam uma sequência idêntica, ou quase idêntica, a uma grande variedade de genes de polimerases de DNA, nos quais se incluem, para além de diversas famílias virais, genes das polimerases de *Archaea*, plantas, fungos, ciliados, plasmódios, nemátodes, equinodermes, insectos e vertebrados. Estes autores referem ainda que as células e tecidos do hospedeiro vertebrado representam a principal fonte de produtos de PCR indesejados aquando do uso destes *primers*, mas que, uma vez que os genes da DNA polimerase dos vertebrados contêm intrões, os produtos amplificados a partir do genoma do hospedeiro (*e.g.* 2622 nt para *Mus musculus*) serão de muito maiores dimensões do que aqueles amplificados a partir de um genoma viral.

Contudo, conforme se verificou neste estudo, as principais fontes de produtos não desejados são bacterianas, em particular as bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, uma vez que não é possível distinguir entre um produto da amplificação de uma polimerase de DNA ou fosfolipase enterobacteriana e um produto de amplificação de uma polimerase de DNA viral, dado que ambos apresentam comprimentos muito idênticos, entre os 400 e 600 bp. Assim, conclui-se que estes *primers* não serão os mais indicados para estudos que pretendam fazer a detecção viral em tecidos potencialmente infectados ou contaminados com agentes bacterianos, como é o caso dos órgãos animais.

Adicionalmente, foi efectuada a pesquisa de herpesvírus em amostras de baço extraídas com o reagente TRIsure (*vide* ANEXOS – TABELA 2), usando este mesmo protocolo de PCR. Voltou-se assim a obter amplificação para todos os animais, o que confirma a presença de DNA amplificável nas amostras extraídas com este método.

Na TABELA 3 pode-se observar um resumo dos resultados obtidos para as cinco famílias virais estudadas.

TABELA 3. Resultados obtidos por RT-PCR e PCR para as diversas famílias virais em estudo, por roedor.

ID roedor	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Arenaviridae</i>	<i>Flaviviridae</i>	<i>Picornaviridae</i>	<i>Herpesviridae</i>
Mi1	–	–	–	–	–
Mi2	–	–	–	–	–
Mi3	–	–	FP	–	–
Mi4	–	–	–	–	–
Mi5	–	–	–	–	–
Mi6	–	–	–	–	–
Mi7	–	–	–	+	–
Mi8	–	–	–	–	–
Mi9	–	–	FP	–	–
Mi10	–	–	–	–	–
Mi11	–	–	–	–	–
Mi12	–	–	–	–	–
Mi13	–	–	–	–	–
Mi14	–	–	–	–	–
Mi15	–	–	–	–	–
Mi16	–	–	–	FP	FP
Mi17	–	–	FP	–	–
Mi18	–	–	FP	–	–
Mi19	–	–	–	–	–
Mi20	–	–	FP	–	–
Mi21	–	–	–	–	FP
Mi22	–	–	–	–	–
Mi23	–	–	–	–	–
A1	–	–	–	–	–
A3	–	–	–	–	–
A4	–	–	–	–	–
A6	–	–	FP	–	–
A7	–	–	–	–	–
A8	–	–	–	–	–
A9	–	–	FP	–	–
A10	NE	NE	NE	NE	–
A11	NE	NE	NE	NE	–
A12	NE	NE	NE	NE	–
Mu1	FP	–	–	–	–

+: Positivo (houve amplificação)

FP: Falso positivo (amplificação inespecífica)

–: Negativo (não houve amplificação)

NE: Não efectuado

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento das infecções emergentes, como resultado das alterações antropogénicas da biosfera e da globalização. O aquecimento global, a sobreexploração de recursos naturais, tais como as florestas e os *stocks* pesqueiros, e a industrialização da criação pecuária têm vindo a provocar a destruição dos meios naturais e fragmentação de habitats. Estas alterações da biosfera propiciam o surgimento local de zoonoses a partir dos seus biótopos naturais, favorecido por um aumento artificial das interações entre estes patogénios, animais domésticos e populações humanas. Subsequentemente, o comércio internacional, as migrações animais e humanas, e as viagens favorecem a disseminação mundial destes agentes zoonóticos.

Os roedores selvagens são um dos principais grupos animais a representar um problema grave em termos de saúde pública, já que são reservatórios permanentes de zoonoses na natureza, desempenhando um papel fulcral na transmissão destes agentes infecciosos. Da fauna portuguesa fazem parte 13 espécies de roedores [100], algumas das quais apresentam uma distribuição geográfica alargada a todo o país, podendo ocupar habitats em zonas rurais ou urbanas. Dada esta tendência de algumas espécies viverem como comensais dos seres humanos, urge esclarecer o seu papel como veículos de transmissão de diversas zoonoses virais.

Lamentavelmente, os poucos estudos que versam esta problemática em Portugal foram conduzidos, a vasta maioria, entre meados das décadas de 70 e 90 do século XX, não havendo assim uma caracterização da situação actual destes agentes virais e dos seus reservatórios murinos no nosso país, contrariando a tendência recente observada noutros territórios europeus e do mundo, onde esta problemática tem vindo a ser amplamente investigada.

Apesar de os resultados obtidos no presente estudo indicarem que não se esteja perante uma situação alarmante, há também que ter em consideração que, dada a reduzida dimensão da amostra analisada, esses mesmos resultados não sejam conclusivos. Como já foi referido, a destruição e fragmentação de habitats, bem como a penetração cada vez maior, por parte da espécie humana, em meios selvagens e previamente inexplorados, constitui um sério risco em termos de propagação de zoonoses virais, afigurando-se como particularmente preocupantes as novas espécies virais, ainda não caracterizadas.

Assim sendo, será de suma importância a implementação de um plano de rastreio em larga escala de infecções zoonóticas, englobando todo o território português (continente e ilhas; meios naturais, rurais, urbanos e periurbanos) – que inclua não só potenciais reservatórios e vectores silvestres, como também hospedeiros humanos – com vista a identificar e caracterizar possíveis focos de infecção. Nesse aspecto, considera-se que o trabalho ora apresentado foi de extrema utilidade, pois permitiu ensaiar e otimizar diversas metodologias que poderão vir a ser implementadas em estudos futuros. De seguida, serão enumerados e discutidos alguns aspectos, que deverão ser tidos em consideração nesses mesmos estudos.

RNA – Cuidados a ter na sua manipulação. No decurso deste trabalho foram seguidas a maioria das recomendações para o manuseamento do RNA, nomeadamente, o uso de material dedicado, de pontas com filtro, de reagentes, soluções e consumíveis RNase-free, a mudança frequente de luvas e a rapidez no processamento das amostras, processamento esse que deverá ocorrer, sempre que possível, a baixa temperatura (0 – 4 °C). Contudo, devido a constrangimentos logísticos e metodológicos, há dois preceitos geralmente recomendados que não foram observados. São eles a extracção a partir de amostras frescas e o *flash freezing* das mesmas. Ainda assim, os resultados obtidos através do controlo de qualidade, efectuado para o mRNA da β -actina, indicam que os cuidados anteriormente referidos foram suficientes para a obtenção de RNA amplificável de boa qualidade, e que o facto de as amostras não terem sido processadas a fresco nem sido sujeitas a *flash freezing* não comprometeu esta tarefa. Adicionalmente, verificou-se que o reagente TRIsure, para além da extracção do RNA, possibilitou também a conservação das amostras até à sua efectiva extracção, funcionando assim como um estabilizador de RNA.

Contudo, recomenda-se sempre o exercício de um princípio de precaução. Preferencialmente, e caso seja possível, as amostras deverão ser processadas a fresco e sujeitas a *flash freezing*. Para as amostras colhidas no campo, recomenda-se em alternativa ao *flash freezing*, a conservação num reagente de estabilização do RNA (e.g. RNAlater, Qiagen).

Primers específicos vs. primers degenerados – Quais escolher? De uma forma geral, considera-se que os *primers* degenerados serão bastante úteis para a detecção de um número alargado de espécies virais, que poderão, inclusivamente, estar ou não descritas. Assim, considera-se que o uso generalizado destes *primers* se adequou ao presente estudo (apenas para a pesquisa de picornavírus se usaram unicamente *primers* específicos), pois permitiu pesquisar um vasto leque de espécies virais, sem incidir nesta ou naquela em particular, uma vez que pouco se sabe acerca da situação destes agentes infecciosos em Portugal – em particular, quais os vírus que estarão em circulação no nosso país.

Contudo, a utilização destes *primers* apresenta algumas limitações, geralmente tanto maiores quanto maior for o número de bases degeneradas. Conforme se verificou, dada a complexidade do genoma dos roedores e a presença natural de bactérias nos seus tecidos, houve por vezes dificuldade em obter produtos de amplificação específicos, o que foi agravado pela presença de produtos com o comprimento esperado, mas inespecíficos/indesejados. Como exemplo, refiram-se os *primers* degenerados usados para a detecção de flavivírus e de herpesvírus, sendo que estes últimos acabam por funcionar como *primers* universais para polimerases de DNA.

Como tal, recomenda-se que, caso se opte pela utilização de *primers* degenerados, esta funcione como uma triagem inicial das amostras, sendo posteriormente complementada, se necessário, com o uso de *primers* mais específicos.

Controlos positivos – Usar ou não usar? Os controlos positivos, apesar de úteis, poderão constituir uma potencial fonte de contaminação laboratorial. Se, para o ensaio e optimização de novos *primers*, a sua utilização se perfigura essencial, o seu uso em conjunto com *primers* já

testados poderá ser preterido, sendo colmatado com a utilização de uma boa metodologia de controlo de qualidade.

Imunologia e Biologia Molecular – Duas abordagens complementares. Dada a metodologia de amostragem escolhida neste estudo, foi possível aplicar directamente uma das técnicas tidas como mais fiáveis, sensíveis e específicas para a pesquisa e caracterização de vírus: a detecção por PCR ou RT-PCR. Num plano de rastreio mais alargado, em que seja necessário amostrar um elevado número de roedores, esta metodologia deverá ser complementada com um rastreio serológico, que vise a detecção de anticorpos e/ou de antígenos virais, por forma a que não se sacrifiquem animais desnecessariamente. Apenas os animais que apresentem serologia positivas deverão ser então processados, e amostrados para a detecção por amplificação de ácidos nucleicos virais.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Filomena Caeiro, por ter aceite orientar esta dissertação. Pela amizade e simpatia com que me acolheu no seu laboratório, pelo seu entusiasmo, pelo constante apoio e acompanhamento aos mais diversos níveis, pelos seus valiosos ensinamentos e por estar disponível sempre que foi necessário.

À Doutora Cristiane Bastos-Silveira, do Museu Nacional de História Natural, sem a qual este projecto não teria sido possível. Por se ter disponibilizado a financiar boa parte do trabalho e a criar condições para que este navio pudesse chegar a bom porto. Bem como pela preciosa ajuda na extracção de DNA de tecidos animais, pelas suas sugestões e aconselhamento, tanto técnico-científico como pessoal, e pelo seu pragmatismo. Mas, sobretudo, por possuir essa rara virtude de gostar de ajudar o próximo.

À Ana Cerveira e à Rita Monarca, pelas conversas e por me terem cedido os seus animais.

Às colegas de laboratório na Faculdade de Ciências, Egídia Azevedo, Priscila Vale, Fabiane Carrijo e Nasrin Seyedi, pela amizade e boa disposição, pelo apoio nos bons e maus momentos desta luta de amplificações (a BioMol é, de facto, mágica e mística!) e pelo saudável contributo para a ‘entropia do sistema’. À Priscila Vale, que já não se encontra entre nós, um agradecimento especial. Foi um privilégio conhecer-te. Espero muito sinceramente que nos voltemos a encontrar um dia.

À Teresa Granja, pela sua simpatia e sorriso franco, pelo apoio e motivação, bem como pela sua ajuda e sugestões para o trabalho laboratorial.

À Célia Lima, pelo bom humor e ânimo, e por estar disponível sempre que era necessário material para o laboratório.

Aos colegas do MNHN, Andreia Matos, Joaquim Tapisso, Margarida Duarte e Patrícia Sardinha, pela ajuda, pelos conselhos, pelas conversas, discussões e críticas construtivas, e por serem incondicionalmente boas pessoas. À Margarida Duarte, em particular, pela ajuda com os PCRs e com o alinhamento de sequências. E à Andreia Matos, pela cedência do seu *Mus spretus*.

À Rute Félix, pela simpatia e disponibilidade com que me recebeu no Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

Aos amigos Tiago, Tânia, Emanuel, Nádia, Bruno, Carlos, e a todos aqueles que, de uma forma ou doutra, estiveram presentes e me apoiaram ao longo deste ano tão difícil.

Ao Daniel, por tudo. E mais alguma coisa de que me possa estar a esquecer.

À minha Família, e em particular aos meus Pais, por, passados todos estes anos, continuarem a apoiar incondicionalmente esta minha ‘ideia louca’ de querer ser investigadora em Portugal. À minha Mãe, um agradecimento especial, pela revisão linguística do texto desta dissertação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Epstein PR. Emerging diseases and ecosystem instability: new threats to public health. *Am J Public Health*. 1995 Feb;85(2):168-72.
2. Berns DS, Rager B. Emerging infectious diseases: a cause for concern. *Isr Med Assoc J*. 2000 Dec;2(12):919-23.
3. Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis*. 1995 Jan-Mar;1(1):7-15.
4. Daszak P, Cunningham AA. Anthropogenic change, biodiversity loss and a new agenda for emerging diseases. *J Parasitol*. 2003 Apr;89 Suppl:S37-41.
5. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Trop*. 2001 Feb;78(2):103-16.
6. Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001 Jul;356(1411):983-9.
7. Cleaveland S, Laurenson MK, Taylor LH. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001 Jul;356(1411):991-9.
8. Kruse H, Kirkemo AM, Handeland K. Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerg Infect Dis*. 2004 Dec;10(12):2067-72.
9. Cunningham AA. A walk on the wild side – emerging wildlife diseases. *BMJ*. 2005 Nov;331(7527):1214-5.
10. Cabello CC, Cabello FC. Zoonosis con reservorios silvestres: amenazas a la salud pública y a la economía. *Rev Med Chil*. 2008 Mar;136(3):385-93.
11. Vorou RM, Papavassiliou VG, Tsiodras S. Emerging zoonoses and vector-borne infections affecting humans in Europe. *Epidemiol Infect*. 2007 Nov;135(8):1231-47. Epub 2007 Apr 20.
12. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. *Science*. 2000 Jan;287(5452):443-9. Erratum in: *Science* 2000 Mar;287(5459):1756.
13. Blancou J, Chomel BB, Belotto A, Meslin FX. Emerging or re-emerging bacterial zoonoses: factors of emergence, surveillance and control. *Vet Res*. 2005 May-Jun;36(3):507-22.
14. Bennett M, Begon ME. Virus zoonoses – a long-term overview. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1997 Feb;20(2):101-9.
15. Kallio-Kokko H, Uzategui N, Vapalahti O, Vaheri A. Viral zoonoses in Europe. *FEMS Microbiol Rev*. 2005 Nov;29(5):1051-77. Epub 2005 Jun 29.
16. Clements AC, Pfeiffer DU. Emerging viral zoonoses: frameworks for spatial and spatiotemporal risk assessment and resource planning. *Vet J*. 2009 Oct;182(1):21-30. Epub 2008 Aug 20.

17. Mills JN, Childs JE. Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance for human health. *Emerg Infect Dis.* 1998 Oct-Dec;4(4):529-37.
18. Wilson DE, Reeder DM, editors. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference.* 3rd ed. Baltimore (MD): Johns Hopkins University Press; 2005. 2142 p.
19. Moutou F, Artois M. Les mammifères sauvages réservoirs potentiels de zoonoses. *Méd Mal Infect.* 2001 Mar;31 Suppl 2:159-67.
20. Schmaljohn CS, Nichol ST. *Bunyaviridae.* In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields Virology.* Vol. 2. 5th ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1741-89.
21. Hart CA, Bennett M. Hantavirus infections: epidemiology and pathogenesis. *Microbes Infect.* 1999 Dec;1(14):1229-37.
22. Gegúndez MI, Lledó L. Infección por hantavirus y otros virus transmitidos por roedores. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005 Oct;23(8):492-500.
23. Kariwa H, Yoshimatsu K, Arikawa J. Hantavirus infection in East Asia. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2007 Sep;30(5-6):341-56. Epub 2007 Jul 25.
24. Filipe AR. Bunyavírus. In: Ferreira WF, Sousa JC, editors. *Microbiologia.* Vol. 3. Lisboa: Lidel Edições Técnicas; 2002. p. 209-12.
25. Chapman LE. Hantaviruses. *Semin Pediatr Infect Dis.* 1996 Apr;7(2):97-100.
26. Krüger DH, Ulrich R, Lundkvist AA. Hantavirus infections and their prevention. *Microbes Infect.* 2001 Nov;3(13):1129-44.
27. Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, Henttonen H, Plyusnin A, Vaheri A. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis.* 2003 Oct;3(10):653-61.
28. McCaughey C, Hart CA. Hantaviruses. *J Med Microbiol.* 2000 Jul;49(7):587-99.
29. Schmaljohn C, Hjelle B. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg Infect Dis.* 1997 Apr-Jun;3(2):95-104.
30. Bi Z, Formenty PB, Roth CE. Hantavirus infection: a review and global update. *J Infect Dev Ctries.* 2008 Feb;2(1):3-23.
31. Vahlenkamp M, Müller T, Tackmann K, Löschner U, Schmitz H, Schreiber M. The muskrat (*Ondatra zibethicus*) as a new reservoir for puumala-like hantavirus strains in Europe. *Virus Res.* 1998 Oct;57(2):139-50.
32. Bowen MD, Gelbmann W, Ksiazek TG, Nichol ST, Nowotny N. Puumala virus and two genetic variants of Tula virus are present in Austrian rodents. *J Med Virol.* 1997 Oct;53(2):174-81.
33. Escutenaire S, Chalon P, Verhagen R, Heyman P, Thomas I, Karelle-Bui L, Avsic-Zupanc T, Lundkvist A, Plyusnin A, Pastoret P. Spatial and temporal dynamics of Puumala hantavirus infection in red bank vole (*Clethrionomys glareolus*) populations in Belgium. *Virus Res.* 2000 Mar;67(1):91-107.
34. Asikainen K, Hänninen T, Henttonen H, Niemimaa J, Laakkonen J, Andersen HK, Bille N, Leirs H, Vaheri A, Plyusnin A. Molecular evolution of puumala hantavirus in Fennoscandia:

- phylogenetic analysis of strains from two recolonization routes, Karelia and Denmark. J Gen Virol. 2000 Dec;81(Pt 12):2833-41.
35. Sibold C, Meisel H, Lundkvist A, Schulz A, Cifire F, Ulrich R, Kozuch O, Labuda M, Krüger DH. Short report: simultaneous occurrence of Dobrava, Puumala, and Tula Hantaviruses in Slovakia. Am J Trop Med Hyg. 1999 Sep;61(3):409-11.
36. Avsic-Zupanc T, Petrovec M, Duh D, Plyusnina A, Lundkvist A, Plyusnin A. Puumala hantavirus in Slovenia: analyses of S and M segment sequences recovered from patients and rodents. Virus Res. 2007 Feb;123(2):204-10. Epub 2006 Sep 25.
37. Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Hovi T, von Bonsdorff CH, Vuorimies J, Manni T, Penttinen K, Oker-Blom N, Lähdevirta J. Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. J Infect Dis. 1980 Feb;141(2):131-4.
38. Augot D, Muller D, Demerson JM, Boué F, Caillot C, Cliquet F. Dynamics of Puumala virus infection in bank voles in Ardennes department (France). Pathol Biol (Paris). 2006 Dec;54(10):572-7. Epub 2006 Oct 5.
39. Lundkvist A, Wiger D, Hörling J, Sjölander KB, Plyusnina A, Mehl R, Vaheri A, Plyusnin A. Isolation and characterization of Puumala hantavirus from Norway: evidence for a distinct phylogenetic sublineage. J Gen Virol. 1998 Nov;79(Pt 11):2603-14.
40. Nowakowska A, Heyman P, Knap JP, Burzyński W, Witas M. The first established focus of hantavirus infection in Poland, 2007. Ann Agric Environ Med. 2009 Jun;16(1):79-85.
41. Hörling J, Cheng Y, Plyusnin A, Persson K, Lehväsliho H, Vaheri A, Niklasson B, Lundkvist A. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the M and S genome segments of a Swedish Puumala virus isolate. Virus Res. 1995 Dec;39(2-3):321-30.
42. Klempa B, Schütt M, Auste B, Labuda M, Ulrich R, Meisel H, Krüger DH. First molecular identification of human Dobrava virus infection in central Europe. J Clin Microbiol. 2004 Mar;42(3):1322-5.
43. Avsic-Zupanc T, Nemirov K, Petrovec M, Trilar T, Poljak M, Vaheri A, Plyusnin A. Genetic analysis of wild-type Dobrava hantavirus in Slovenia: co-existence of two distinct genetic lineages within the same natural focus. J Gen Virol. 2000 Jul;81(Pt 7):1747-55.
44. Nemirov K, Vapalahti O, Lundkvist A, Vasilenko V, Golovljova I, Plyusnina A, Niemimaa J, Laakkonen J, Henttonen H, Vaheri A, Plyusnin A. Isolation and characterization of Dobrava hantavirus carried by the striped field mouse (*Apodemus agrarius*) in Estonia. J Gen Virol. 1999 Feb;80(Pt 2):371-9.
45. Papa A, Johnson AM, Stockton PC, Bowen MD, Spiropoulou CF, Alexiou-Daniel S, Ksiazek TG, Nichol ST, Antoniadis A. Retrospective serological and genetic study of the distribution of hantaviruses in Greece. J Med Virol. 1998 Aug;55(4):321-7.
46. Scharninghausen JJ, Meyer H, Pfeffer M, Davis DS, Honeycutt RL. Genetic evidence of Dobrava virus in *Apodemus agrarius* in Hungary. Emerg Infect Dis. 1999 May-Jun;5(3):468-70.
47. Kallio-Kokko H, Laakkonen J, Rizzoli A, Tagliapietra V, Cattadori I, Perkins SE, Hudson PJ, Cristofolini A, Versini W, Vapalahti O, Vaheri A, Henttonen H. Hantavirus and arenavirus

- p>antibody prevalence in rodents and humans in Trentino, Northern Italy.
- Epidemiol Infect.*
- 2006 Aug;134(4):830-6. Epub 2005 Dec 22.
48. Weidmann M, Schmidt P, Vackova M, Krivanec K, Munclinger P, Hufert FT. Identification of genetic evidence for Dobrava virus spillover in rodents by nested reverse transcription (RT)-PCR and TaqMan RT-PCR. *J Clin Microbiol.* 2005 Feb;43(2):808-12.
 49. Klempa B, Tkachenko EA, Dzagurova TK, Yunicheva YV, Morozov VG, Okulova NM, Slyusareva GP, Smirnov A, Krüger DH. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by 2 lineages of Dobrava hantavirus, Russia. *Emerg Infect Dis.* 2008 Apr;14(4):617-25.
 50. Nemirov K, Andersen HK, Leirs H, Henttonen H, Vaheri A, Lundkvist A, Plyusnin A. Saaremaa hantavirus in Denmark. *J Clin Virol.* 2004 Jul;30(3):254-7.
 51. Klempa B, Meisel H, R  th S, Bartel J, Ulrich R, Krüger DH. Occurrence of renal and pulmonary syndrome in a region of northeast Germany where Tula hantavirus circulates. *J Clin Microbiol.* 2003 Oct;41(10):4894-7.
 52. Plyusnina A, Laakkonen J, Niemimaa J, Henttonen H, Plyusnin A. New genetic lineage of Tula hantavirus in *Microtus arvalis obscurus* in Eastern Kazakhstan. *Open Virol J.* 2008;2:32-6. Epub 2008 Apr 3.
 53. Sibold C, Meisel H, Krüger DH, Labuda M, Lysy J, Kozuch O, Pejcoch M, Vaheri A, Plyusnin A. Recombination in Tula hantavirus evolution: analysis of genetic lineages from Slovakia. *J Virol.* 1999 Jan;73(1):667-75.
 54. Korva M, Duh D, Puterle A, Trilar T, Zupanc TA. First molecular evidence of Tula hantavirus in *Microtus voles* in Slovenia. *Virus Res.* 2009 Sep;144(1-2):318-22. Epub 2009 May 4.
 55. Plyusnina A, Deter J, Charbonnel N, Cosson JF, Plyusnin A. Puumala and Tula hantaviruses in France. *Virus Res.* 2007 Oct;129(1):58-63. Epub 2007 May 25.
 56. Reusken C, de Vries A, Adema J, Vos W, van der Giessen J, Bekker D, Heyman P. First genetic detection of Tula hantavirus in wild rodents in the Netherlands. *J Infect.* 2008 Dec;57(6):500-3. Epub 2008 Nov 1.
 57. Plyusnin A, Cheng Y, Vapalahti O, Pejcoch M, Unar J, Jelinkova Z, Lehv  slaiho H, Lundkvist A, Vaheri A. Genetic variation in Tula hantaviruses: sequence analysis of the S and M segments of strains from Central Europe. *Virus Res.* 1995 Dec;39(2-3):237-50.
 58. Plyusnin A, Vapalahti O, Lankinen H, Lehv  slaiho H, Apekina N, Myasnikov Y, Kallio-Kokko H, Henttonen H, Lundkvist A, Brummer-Korvenkontio M, Gavrillovskaya I, Vaheri A. Tula virus: a newly detected hantavirus carried by European common voles. *J Virol.* 1994 Dec;68(12):7833-9.
 59. Song JW, Gligic A, Yanagihara R. Identification of Tula hantavirus in *Pitymys subterraneus* captured in the Cacak region of Serbia-Yugoslavia. *Int J Infect Dis.* 2002 Mar;6(1):31-6.
 60. Charrel RN, Coutard B, Baronti C, Canard B, Noug  re A, Frangeul A, Morin B, Jamal S, Schmidt CL, Hilgenfeld R, Klempa B, de Lamballerie X. Arenaviruses and hantaviruses: from epidemiology and genomics to antivirals. *Antiviral Res.* 2011 Feb 26. [Epub ahead of print].
 61. Filipe AR. Aren  v  rus. In: Ferreira WF, Sousa JC, editors. *Microbiologia*. Vol. 3. Lisboa: Lidel Edições Técnicas; 2002. p. 217-9.

62. Emonet SE, Urata S, de la Torre JC. Arenavirus reverse genetics: new approaches for the investigation of arenavirus biology and development of antiviral strategies. *Virology*. 2011 Mar;411(2):416-25. Epub 2011 Feb 15.
63. Bowen MD, Peters CJ, Nichol ST. Phylogenetic analysis of the *Arenaviridae*: patterns of virus evolution and evidence for cospeciation between arenaviruses and their rodent hosts. *Mol Phylogenet Evol*. 1997 Dec;8(3):301-16.
64. Hugot JP, Gonzalez JP, Denys C. Evolution of the Old World *Arenaviridae* and their rodent hosts: generalized host-transfer or association by descent? *Infect Genet Evol*. 2001 Jul;1(1):13-20.
65. Emonet SF, de la Torre JC, Domingo E, Sevilla N. Arenavirus genetic diversity and its biological implications. *Infect Genet Evol*. 2009 Jul;9(4):417-29. Epub 2009 Mar 25.
66. de la Torre JC. Reverse genetics approaches to combat pathogenic arenaviruses. *Antiviral Res*. 2008 Dec;80(3):239-50. Epub 2008 Sep 7.
67. Blasdell KR, Becker SD, Hurst J, Begon M, Bennett M. Host range and genetic diversity of arenaviruses in rodents, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*. 2008 Sep;14(9):1455-8.
68. Tagliapietra V, Rosà R, Hauffe HC, Laakkonen J, Voutilainen L, Vapalahti O, Vaheri A, Henttonen H, Rizzoli A. Spatial and temporal dynamics of lymphocytic choriomeningitis virus in wild rodents, northern Italy. *Emerg Infect Dis*. 2009 Jul;15(7):1019-25.
69. Ledesma J, Fedele CG, Carro F, Lledó L, Sánchez-Seco MP, Tenorio A, Soriguer RC, Saz JV, Domínguez G, Rosas MF, Barandika JF, Gegúndez MI. Independent lineage of lymphocytic choriomeningitis virus in wood mice (*Apodemus sylvaticus*), Spain. *Emerg Infect Dis*. 2009 Oct;15(10):1677-80.
70. Leyssen P, de Clercq E, Neyts J. Perspectives for the treatment of infections with *Flaviviridae*. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Jan;13(1):67-82.
71. Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe*. 2009 Apr;5(4):318-28.
72. Pastorino B, Nougairède A, Wurtz N, Gould E, de Lamballerie X. Role of host cell factors in flavivirus infection: implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. *Antiviral Res*. 2010 Sep;87(3):281-94. Epub 2010 May 7.
73. Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR, Solomon T. Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis. *J Gen Virol*. 2009 Aug;90(Pt 8):1781-94. Epub 2009 May 6.
74. Mantke OD, Schädler R, Niedrig M. A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries. *Euro Surveill*. 2008 Apr 24;13(17). pii: 18848. PubMed PMID: 18445446.
75. Bakhvalova VN, Potapova OF, Panov VV, Morozova OV. Vertical transmission of tick-borne encephalitis virus between generations of adapted reservoir small rodents. *Virus Res*. 2009 Mar;140(1-2):172-8. Epub 2009 Jan 14.
76. Dobler G. Zoonotic tick-borne flaviviruses. *Vet Microbiol*. 2010 Jan;140(3-4):221-8. Epub 2009 Aug 26.

77. Ferreira WF. Picornavírus. In: Ferreira WF, Sousa JC, editors. Microbiologia. Vol. 3. Lisboa: Lidel Edições Técnicas; 2002. p. 161-85.
78. Paul S, Michiels T. Cardiovirus leader proteins are functionally interchangeable and have evolved to adapt to virus replication fitness. J Gen Virol. 2006 May;87(Pt 5):1237-46.
79. Johansson S, Niklasson B, Maizel J, Gorbalenya AE, Lindberg AM. Molecular analysis of three Ljungan virus isolates reveals a new, close-to-root lineage of the *Picornaviridae* with a cluster of two unrelated 2A proteins. J Virol. 2002 Sep;76(17):8920-30.
80. Denis P, Liebig HD, Nowotny N, Billinis C, Papadopoulos O, O'Hara RS, Knowles NJ, Koenen F. Genetic variability of encephalomyocarditis virus (EMCV) isolates. Vet Microbiol. 2006 Mar;113(1-2):1-12. Epub 2006 Jan 6.
81. Doi K. Experimental encephalomyocarditis virus infection in small laboratory rodents. J Comp Pathol. 2011 Jan;144(1):25-40. Epub 2010 Jul 1.
82. Billinis C. Encephalomyocarditis virus infection in wildlife species in Greece. J Wildl Dis. 2009 Apr;45(2):522-6.
83. Brewer LA, Lwamba HC, Murtaugh MP, Palmenberg AC, Brown C, Njenga MK. Porcine encephalomyocarditis virus persists in pig myocardium and infects human myocardial cells. J Virol. 2001 Dec;75(23):11621-9.
84. Oberste MS, Gotuzzo E, Blair P, Nix WA, Ksiazek TG, Comer JA, Rollin P, Goldsmith CS, Olson J, Kochel TJ. Human febrile illness caused by encephalomyocarditis virus infection, Peru. Emerg Infect Dis. 2009 Apr;15(4):640-6.
85. Canelli E, Luppi A, Lavazza A, Lelli D, Sozzi E, Martin AM, Gelmetti D, Pascotto E, Sandri C, Magnone W, Cordioli P. Encephalomyocarditis virus infection in an Italian zoo. Virol J. 2010 Mar 18;7:64. doi: 10.1186/1743-422X-7-64. PubMed PMID: 20298561; PubMed Central PMCID: PMC2848215
86. Knowles NJ, Dickinson ND, Wilsden G, Carra E, Brocchi E, de Simone F. Molecular analysis of encephalomyocarditis viruses isolated from pigs and rodents in Italy. Virus Res. 1998 Sep;57(1):53-62.
87. Lipton HL, Kim BS, Yahikozawa H, Nadler CF. Serological evidence that *Mus musculus* is the natural host of Theiler's murine encephalomyelitis virus. Virus Res. 2001 Jul;76(1):79-86.
88. Ekström JO, Tolf C, Fahlgren C, Johansson ES, Arbrandt G, Niklasson B, Edman KA, Lindberg AM. Replication of Ljungan virus in cell culture: the genomic 5'-end, infectious cDNA clones and host cell response to viral infections. Virus Res. 2007 Dec;130(1-2):129-39. Epub 2007 Jul 23.
89. Niklasson B, Kinnunen L, Hörnfeldt B, Hörling J, Benemar C, Hedlund KO, Matskova L, Hyypiä T, Winberg G. A new picornavirus isolated from bank voles (*Clethrionomys glareolus*). Virology. 1999 Mar;255(1):86-93.
90. McDonald AG. Ljungan virus: an emerging zoonosis? Clin Microbiol News. 2009 Dec;31(23):177-82.
91. McGeoch DJ, Rixon FJ, Davison AJ. Topics in herpesvirus genomics and evolution. Virus Res. 2006 Apr;117(1):90-104. Epub 2006 Feb 21.

92. Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res.* 2009 Aug;143(2):222-34. Epub 2009 Apr 7.
93. Blackman MA, Flaño E, Usherwood E, Woodland DL. Murine γ -herpesvirus-68: a mouse model for infectious mononucleosis? *Mol Med Today.* 2000 Dec;6(12):488-90.
94. Wagner M, Ruzsics Z, Koszinowski UH. Herpesvirus genetics has come of age. *Trends Microbiol.* 2002 Jul;10(7):318-24.
95. Babiuk LA, Rouse BT. Herpesvirus vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 1996 Aug;21(1):63-76.
96. Ehlers B, Küchler J, Yasmum N, Dural G, Voigt S, Schmidt-Chanasit J, Jäkel T, Matuschka FR, Richter D, Essbauer S, Hughes DJ, Summers C, Bennett M, Stewart JP, Ulrich RG. Identification of novel rodent herpesviruses, including the first gammaherpesvirus of *Mus musculus*. *J Virol.* 2007 Aug;81(15):8091-100. Epub 2007 May 16.
97. Teterina A, Richter D, Matuschka FR, Ehlers B, Voigt S. Identification of a novel betaherpesvirus in *Mus musculus*. *Virol J.* 2009 Dec 21;6:225. doi: 10.1186/1743-422X-6-225. PubMed PMID: 20025745; PubMed PMCID: PMC2804612.
98. Davison AJ. Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol.* 2010 Jun;143(1):52-69. Epub 2010 Feb 11.
99. Tischer BK, Osterrieder N. Herpesviruses – a zoonotic threat? *Vet Microbiol.* 2010 Jan;140(3-4):266-70. Epub 2009 Jun 21.
100. Mathias ML, Ramalhinho MG, Palmeirim J, Rodrigues L, Rainho A, Ramos MJ, Santos-Reis M, Petrucci-Fonseca F, Oom MM, Cabral MJ, Borges JF, Guerreiro A, Magalhães C, Pereira M. Mamíferos terrestres de Portugal Continental, Açores e Madeira. Lisboa: Instituto da Conservação da Natureza; 1999. 200 p.
101. Wang Y, Pereira EF, Maus AD, Ostlie NS, Navaneetham D, Lei S, Albuquerque EX, Conti-Fine BM. Human bronchial epithelial and endothelial cells express $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* 2001 Dec;60(6):1201-9.
102. Sibold C, Sparr S, Schulz A, Labuda M, Kozuch O, Lysý J, Krüger DH, Meisel H. Genetic characterization of a new hantavirus detected in *Microtus arvalis* from Slovakia. *Virus Genes.* 1995 Oct;10(3):277-81.
103. Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J Clin Microbiol.* 2001 May;39(5):1922-7.
104. Hanson LA, Rudis MR, Vasquez-Lee M, Montgomery RD. A broadly applicable method to characterize large DNA viruses and adenoviruses based on the DNA polymerase gene. *Virol J.* 2006 Apr 11;3:28. doi: 10.1186/1743-422X-3-28. PubMed PMID: 16608526; PubMed PMCID: PMC1459111.
105. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* 2000 Feb-Apr;7(1-2):203-14.
106. Dias MM. Red-legged partridge (*Alectoris rufa*): looking for the circulating viruses in this economically relevant species [MSc dissertation]. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2009.

107. Ng SY, Gunning P, Eddy R, Ponte P, Leavitt J, Shows T, Kedes L. Evolution of the functional human β -actin gene and its multi-pseudogene family: conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogenes. *Mol Cell Biol.* 1985 Oct;5(10):2720-32.
108. Man YM, Delius H, Leader DP. Molecular analysis of elements inserted into mouse γ -actin processed pseudogenes. *Nucleic Acids Res.* 1987 Apr;15(8):3291-304.
109. Sibold C, Sparr S, Labuda M, Krüger DH, Meisel H. Detection of hantaviruses by polymerase chain reaction. *Cell Mol Life Sci.* 1996 Apr;52(4):309-10.
110. Byrne-Bailey KG, Weber KA, Chair AH, Bose S, Knox T, Spanbauer TL, Chertkov O, Coates JD. Completed genome sequence of the anaerobic iron-oxidizing bacterium *Acidovorax ebreus* strain TPSY. *J Bacteriol.* 2010 Mar;192(5):1475-6. Epub 2009 Dec 18.

As referências bibliográficas foram redigidas de acordo com os *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* propostos pelo *International Committee of Medical Journal Editors*, seguindo os critérios utilizados pela *U.S. National Library of Medicine*.

ANEXOS

TABELA 1. Dados relativos aos roedores analisados.

ID	Espécie	Sexo	Local de captura	Data de morte	Data de necrópsia	Órgãos colhidos	Observações
Mi1	<i>M. duodecimcostatus</i>	F	Castro Marim*	08/03/10	08/03/10	Ba, Ce, Fi, Pu e Ri	Nascido em cativeiro
Mi2	<i>M. duodecimcostatus</i>	F	Castro Marim	11/03/10	12/03/10	Ba, Ce, Fi, Pu e Ri	
Mi3	<i>M. lusitanicus</i>	F	Portalegre	25/03/10	01/04/10	Ba, Ce, Fi, Pu e Ri	
Mi4	<i>M. lusitanicus</i>	F	Portalegre	25/03/10	01/04/10	Ba, Ce, Fi, Pu e Ri	
Mi5	<i>M. lusitanicus</i>	F	Portalegre	25/03/10	01/04/10	Ba, Ce, Fi, Pu e Ri	
Mi6	<i>M. lusitanicus</i>	F	Portalegre	08/04/10	14/04/10	Ba, Ce, Fi, Pu e Ri	
Mi7	<i>M. lusitanicus</i>	Ind.	Portalegre	08/04/10	19/04/10	Co e Pu	
Mi8	<i>M. lusitanicus</i>	F	Portalegre	08/04/10	19/04/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
Mi9	<i>M. duodecimcostatus</i>	F	Castro Marim	--/04/10	20/04/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
Mi10	<i>M. duodecimcostatus</i>	F	Castro Marim	13/04/10	20/04/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
Mi11	<i>M. lusitanicus</i>	F	Portalegre	08/04/10	06/05/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
Mi12	<i>M. duodecimcostatus</i>	F	Portalegre	--/05/10	18/06/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
Mi13	<i>M. duodecimcostatus</i>	M	Castro Marim	--/06/10	01/07/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
Mi14	<i>M. duodecimcostatus</i>	F	Portalegre	--/06/10	14/07/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
Mi15	<i>M. lusitanicus</i>	M	Portalegre	--/06/10	14/07/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
Mi16	<i>M. lusitanicus</i>	F	Portalegre	--/06/10	14/07/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
Mi17	<i>M. duodecimcostatus</i>	F	Castro Marim	--/06/10	15/07/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
Mi18	<i>M. lusitanicus</i>	F	Portalegre	--/06/10	15/07/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
Mi19	<i>M. lusitanicus</i>	F	Portalegre	--/06/10	16/07/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
Mi20	<i>M. duodecimcostatus</i>	F	Castro Marim*	02/07/10	16/07/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	Nascido em cativeiro
Mi21	<i>M. lusitanicus</i>	M	Portalegre	--/07/10	16/07/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
Mi22	<i>M. duodecimcostatus</i>	F	Portalegre	--/08/10	15/09/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
Mi23	<i>M. duodecimcostatus</i>	F	Castro Marim*	--/08/10	15/09/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	Nascido em cativeiro
A1	<i>A. sylvaticus</i>	F	Portalegre	25/03/10	01/04/10	Ba, Ce, Fi, Pu e Ri	
A3	<i>A. sylvaticus</i>	M	Portalegre	08/04/10	13/04/10	Ba, Ce, Fi, Pu e Ri	
A4	<i>A. sylvaticus</i>	F	Portalegre	08/04/10	14/04/10	Ba, Ce, Fi, Pu e Ri	
A6	<i>A. sylvaticus</i>	F	Portalegre	--/06/10	05/07/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
A7	<i>A. sylvaticus</i>	M	Portalegre	--/06/10	05/07/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
A8	<i>A. sylvaticus</i>	M	Portalegre	--/06/10	01/07/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
A9	<i>A. sylvaticus</i>	F	Portalegre	--/06/10	01/07/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
A10	<i>A. sylvaticus</i>	F	Portalegre	--/06/10	05/07/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
A11	<i>A. sylvaticus</i>	M	Portalegre	26/08/10	15/09/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	
A12	<i>A. sylvaticus</i>	F	Portalegre*	--/08/10	15/09/10	Ba, Co, Fi, Pu e Ri	Nascido em cativeiro
Mu1	<i>M. spretus</i>	M	Viana do Alentejo	19/03/10	19/03/10	Ba, Ce, Fi, Pu e Ri	Sacrificado

F: fêmea; M: macho; Ind.: indeterminado.

Ba: baço; Ce: cérebro; Co: coração; Fi: fígado; Pu: pulmão; Ri: rim.

* Local de captura da progenitora ou dos progenitores

TABELA 2. Órgãos em que foram pesquisados os vírus pertencentes às diversas famílias virais em estudo, por roedor.

ID roedor	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Arenaviridae</i>	<i>Flaviviridae</i>	<i>Picornaviridae</i>	<i>Herpesviridae</i>
Mi1	Pulmão	Rim	Cérebro	Cérebro	Fígado* e baço [†]
Mi2	Pulmão	Rim	Cérebro	Cérebro	Fígado* e baço**
Mi3	Pulmão	Rim	Cérebro	Cérebro	Fígado* e baço**
Mi4	Pulmão	Rim	Cérebro	Cérebro	Fígado* e baço**
Mi5	Pulmão	Rim	Cérebro	Cérebro	Fígado* e baço**
Mi6	Pulmão	Rim	Cérebro	Cérebro	Fígado* e baço**
Mi7	Pulmão	Pulmão	Coração	Coração	Pulmão* e pulmão**
Mi8	Pulmão	Rim	Baço	Coração	Fígado* e baço**
Mi9	Pulmão	Rim	Baço	Coração	Fígado* e baço**
Mi10	Pulmão	Rim	Baço	Coração	Fígado* e baço**
Mi11	Pulmão	Rim	Baço	Coração	Fígado* e baço**
Mi12	Pulmão	Baço	Baço	Coração	Fígado* e baço**
Mi13	Pulmão	Baço	Baço	Coração	Fígado* e baço**
Mi14	Pulmão	Baço	Baço	Coração	Fígado* e baço**
Mi15	Pulmão	Rim	Coração	Coração	Fígado* e baço**
Mi16	Pulmão	Rim	Baço	Coração	Fígado* e baço**
Mi17	Baço	Baço	Baço	Coração	Fígado* e baço**
Mi18	Pulmão	Pulmão	Coração	Coração	Fígado* e baço**
Mi19	Pulmão	Rim	Baço	Coração	Fígado* e baço**
Mi20	Pulmão	Rim	Baço	Coração	Fígado* e baço**
Mi21	Pulmão	Rim	Baço	Coração	Fígado* e baço**
Mi22	Pulmão	Rim	Baço	Coração	Fígado [†] e baço**
Mi23	Pulmão	Rim	Baço	Coração	Fígado [†] e baço**
A1	Pulmão	Baço	Cérebro	Cérebro	Fígado* e baço**
A3	Pulmão	Pulmão	Cérebro	Cérebro	Fígado* e baço**
A4	Pulmão	Rim	Cérebro	Cérebro	Fígado* e baço**
A6	Pulmão	Rim	Baço	Coração	Fígado* e baço**
A7	Pulmão	Baço	Baço	Coração	Fígado* e baço**
A8	Pulmão	Rim	Baço	Coração	Fígado* e baço**
A9	Pulmão	Pulmão	Coração	Coração	Fígado* e baço**
A10	Não efectuada	Não efectuada	Não efectuada	Não efectuada	Fígado* e baço**
A11	Não efectuada	Não efectuada	Não efectuada	Não efectuada	Fígado [†] e baço**
A12	Não efectuada	Não efectuada	Não efectuada	Não efectuada	Fígado [†] e baço**
Mu1	Pulmão	Rim	Cérebro	Cérebro	Fígado* e baço**

* Extracção com fenol-clorofórmio

** Extracção com TRIsure (Bioline)

[†] Extracção com *kit* RTP (Invitex)

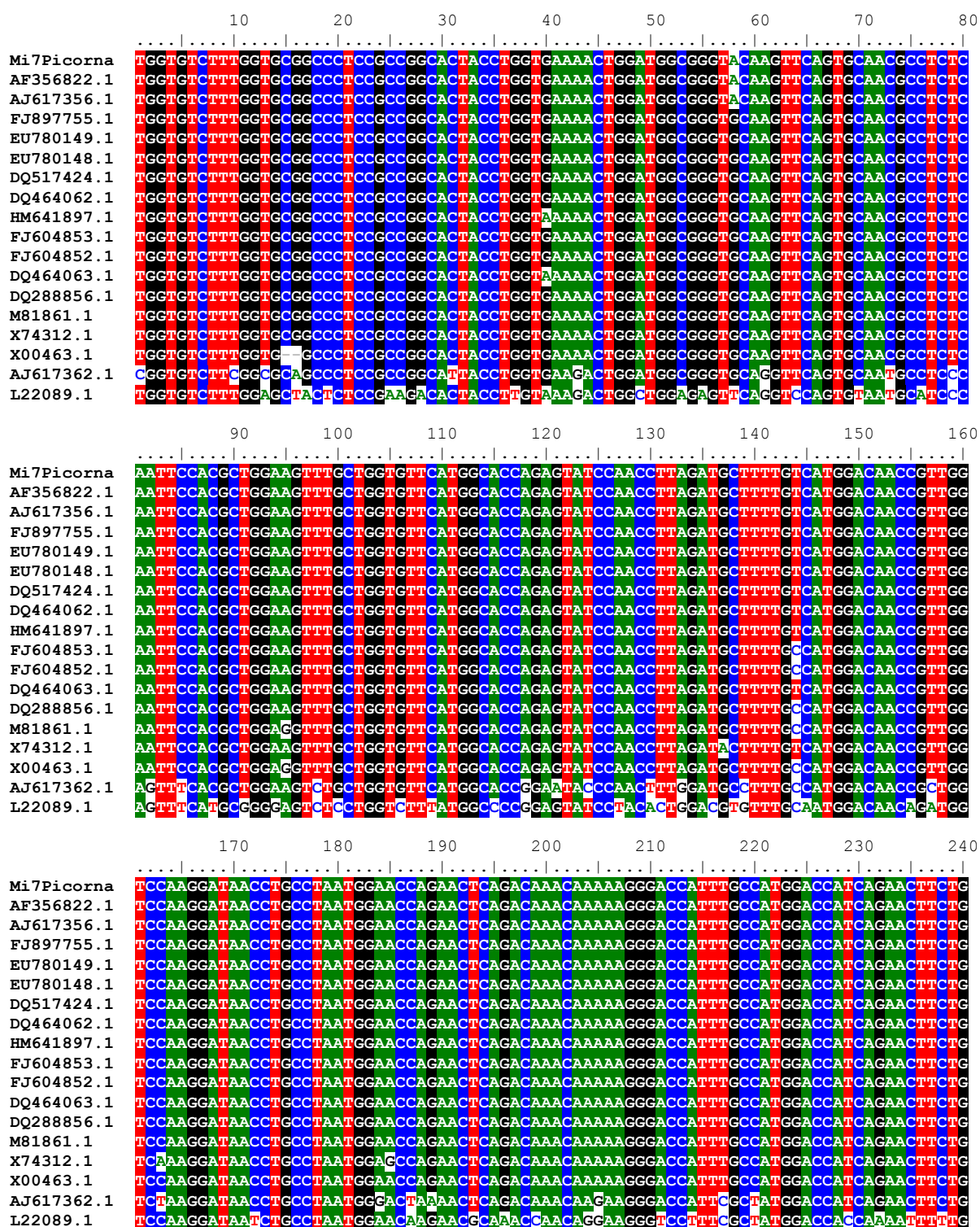


FIGURA 1. Alinhamento de um segmento genômico viral, obtido através da amplificação com os *primers* EMCV F e EMCV R de RNA extraído de uma amostra de coração do animal Mi7 (Mi7Picorna), com diversas sequências virais de interesse. AF356822.1: EMCV estirpe BEL-2887A/91; AJ617356.1: EMCV isolado ATCC VR-129B; FJ897755.1: EMCV estirpe GXLC; EU780149.1: EMCV isolado K11; EU780148.1: EMCV isolado K3; DQ517424.1: EMCV porcino estirpe CBN; DQ464062.1: EMCV estirpe BJC3; HM641897.1: EMCV porcino estirpe NJ08; FJ604853.1: EMCV estirpe GX0602; FJ604852.1: EMCV estirpe GX0601; DQ464063.1: EMCV estirpe HB1; DQ288856.1: EMCV estirpe pEC9; M81861.1: poliproteína do EMCV; X74312.1: genoma completo do EMCV; X00463.1: poliproteína do EMCV; AJ617362.1: EMCV isolado G424/90; L22089.1: Vírus Mengo isolado M.

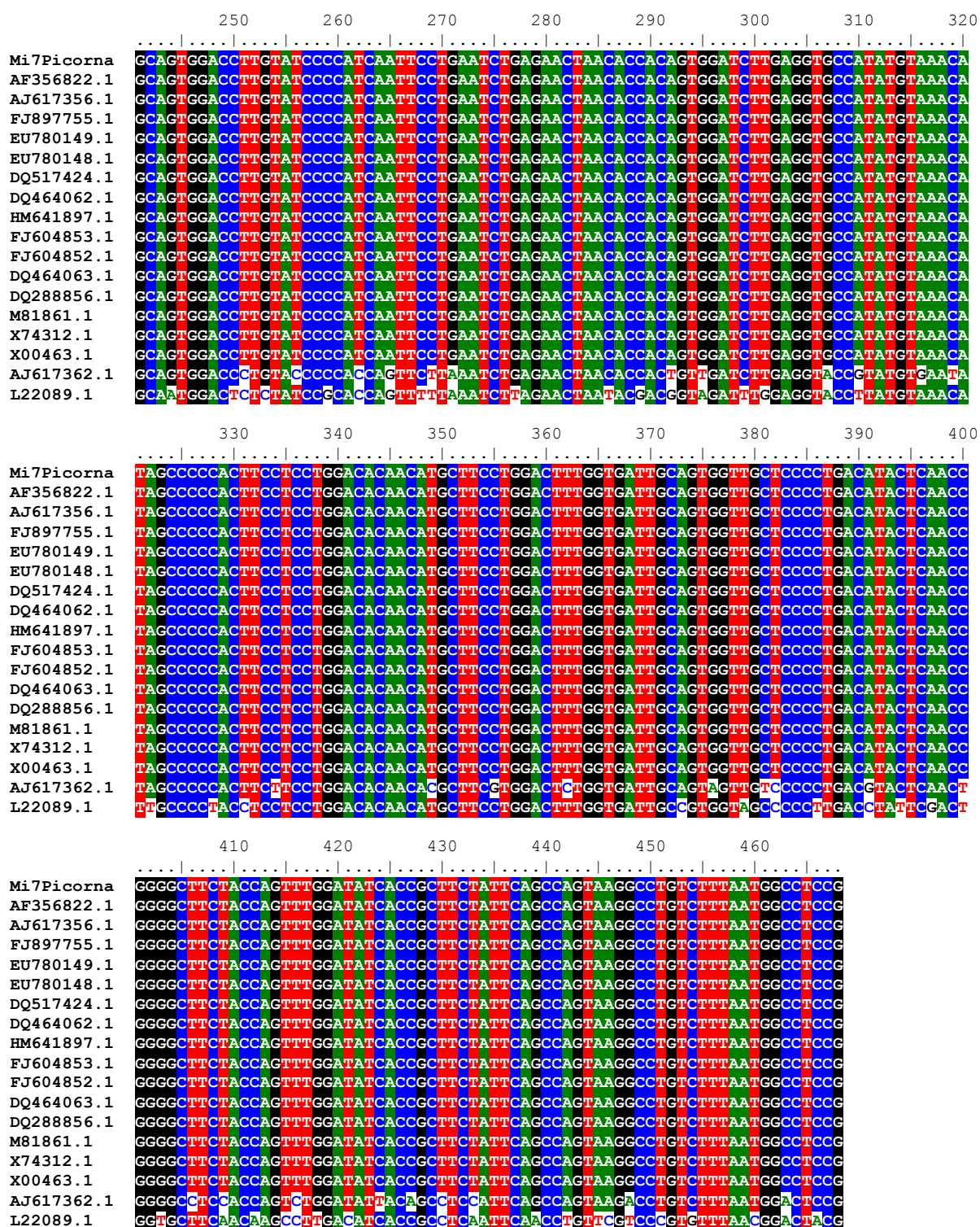


FIGURA 1. (continuação)